

MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER GLYPHOSATTOLERANZ EINER PFLANZLICHEN
ZELLKULTUR VON CORYDALIS SEMPERVIRENS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von
Detlef Johanning
aus Essen

Bochum 1987

Gutachter:

Prof. Dr. N. Amrhein

Prof. Dr. A. Trebst

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	9
1. Zellkulturen	9
2. Chemikalien	9
2.1. Radiochemikalien	9
2.2. Feinchemikalien	9
2.3. Shikimisäure-3-Phosphat (S3P)	9
2.4. 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat (EPSP)	10
3. Bestimmung von Shikimisäure und S3P	10
4. EPSP Synthase-Extraktion und Reinigung	10
4.1. Die konventionelle Reinigung	11
4.2. Die affinitätschromatographische Reinigung	11
5. Enzymmessungen	12
5.1. Die EPSP Synthase	12
5.1.1. Phosphattest	12
5.1.2. Der gekoppelte optische Test	13
5.2. Messungen der Markerenzyme	13
6. Proteinbestimmung	14
7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
7.1. Unter denaturierenden Bedingungen	14
7.2. Unter nicht denaturierenden Bedingungen	14
8. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration	15
9. Chromatofokussierung	15

10.	Immunologische Methoden	16
10.1.	Immunisierung und Gewinnung der Antiseren	16
10.2.	Der Doppelimmuno-Diffusionstest	16
10.3.	Western Blot	16
11.	Inaktivierungsversuche	17
11.1.	-mit N-Ethylmaleimid	17
11.2.	-mit Pyridoxalphosphat	17
12.	SH-Gruppenbestimmung	18
13.	Subzelluläre Lokalisierung der EPSP Synthase	18
14.	Hochdruckflüssigkeits-Chroma- tographie (HPLC) der EPSP Synthase	19
15.	PIC-Aminosäureanalyse	19
16.	Sequenzierung des N-termina- len Endes der EPSP Synthase	20
17.	DNA Isolierung und genetische Analysen	21
17.1.	DNA Isolierung	21
17.2.	Synthese und radioaktive Mar- kierung des 5'-Endes des Oli- gonukleotids	22
17.3.	Restriktion der DNA und Aga- rose-Gelelektrophorese	23
17.4.	Southern Blot	24
17.5.	Hybridisierung mit dem radio- aktiv markierten Oligonukleo- tid	24
17.6.	Dot-Blot Analyse	25
III.	Ergebnisse	26
1.	Glyphosatwirkung in vivo	26

1.1.	Wachstum von glyphosatadaptierten und nicht adaptierten <u>Corydalis sempervirens</u> Kulturen	26
1.2.	Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum nicht adaptierter Kulturen	28
1.3.	Stabilität der erhöhten EPSP Synthase Aktivität glyphosatadaptierter Kulturen	30
2.	Reinigung der EPSP Synthase	32
2.1.	Die konventionelle Reinigung	32
2.2.	Die affinitätschromatographische Reinigung	33
3.	Vergleichende Charakterisierung der EPSP Synthesen aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen	38
3.1.	Molekulargewichtsbestimmung unter denaturierenden Bedingungen	38
3.2.	Gelelektrophorese und Molekulargewichtsbestimmung unter nicht denaturierenden Bedingungen	38
3.3.	Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Chromatofokussierung	40
3.4.	Kinetische Untersuchungen der EPSP Synthesen aus beiden Kulturen	42
3.5.	Immunologische Versuche	48
3.5.1.	Doppelimmuno-Diffusionstest	49
3.5.2.	Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und Western-Blot	50
3.5.3.	Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen und Western-Blot	51
3.5.4.	Hemmung der EPSP Synthase Aktivität durch Antiserum	53

4.	Weitere Untersuchungen der EPSP Synthase aus <u>C.semper-virens</u> Zellkulturen	55
4.1.	Versuche zur Feststellung der Bedeutung verschiedener funktioneller Gruppen für die Aktivität der EPSP Synthase	55
4.1.1.	Inaktivierung der EPSP Synthase durch N-Ethylmaleimid	55
4.1.2.	Inaktivierung durch Pyridoxalphosphat	58
4.1.3.	SH-Gruppenbestimmung	58
4.2.	Subzelluläre Lokalisation der EPSP Synthase in <u>C.semper-virens</u> Zellen	63
5.	Molekulare Grundlagen der Glyphosatoleranz der <u>C.semper-virens</u> Zellkultur	66
5.1.	Reinigung der EPSP Synthase durch HPLC	67
5.2.	PIC-Aminosäureanalyse der EPSP Synthase	68
5.3.	Sequenzierung des N-terminalen Endes der EPSP Synthase	70
5.4.	Quantifizierung der EPSP Synthase kodierenden Gene in glyphosadatadaptierten und nicht adaptierten <u>C.semper-virens</u> Zellkulturen	71
5.4.1.	Isolierung und Restriktionsanalyse der chromosomalen DNA aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen	72
5.4.2.	Dot-Blot Analyse mit ungeschnittener DNA	74
IV.	Diskussion	76
V.	Zusammenfassung	93
VI.	Literaturverzeichnis	95

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	Aminomethanphosphonsäure
ATZ	Anilinothiazolinon
Bq	Bequerel (Zerfälle pro Sekunde)
BSA	Bovine Serum Albumine
c	Konzentration
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
DAHP	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonsäure-7-phosphat
dd-S3P	4',5'-Dideoxyschikimisäure-3-phosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DTE	Dithioerythrol
DINB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EPSP	5-Enolpyruvylschikimisäure-3-phosphat
FG	Frischgewicht
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2'-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt
2-ME	2-Mercaptoethanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
OD	optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
NEM	N-Ethylmaleimid
PALP	Pyridoxalphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	Orthophosphat
PIIC	Phenylisothiocyanat
PIC	Phenylthiocarbamoyl
PIH	Phenylthiohydanthoin
PVP	Polyvinylpyrrolidon

SDS	Natriumdodecylsulfat
S3P	Shikimisäure-3-phosphat
IBS	Tris Buffered Saline
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht/Volumen

I. Einleitung

Ein in den letzten Jahren und Jahrzehnten weltweit ständig steigender Bedarf an Herbiziden belegt deutlich die Bedeutung dieser Chemikalien für die moderne Agrartechnologie. Eine Steigerung der Agrarproduktion und eine Minimierung der Kosten erfordert zwingend den Einsatz von wirksamen Herbiziden in der Landwirtschaft. Um die damit verbundenen Gefahren einer Schädigung der Umwelt gering zu halten oder gänzlich auszuschließen, bedarf es umfassenden und detaillierten Grundwissens über die primären Wirkungen eines Herbizides und seiner sekundären Folgen bedingt durch die Persistenz in der Umwelt, den Abbau unter natürlichen Bedingungen, die Schädigung anderer Organismen usw.. Neben der ökonomischen Bedeutung sind die Herbizide auch für die Grundlagenforschung besonders interessant. Sie können eingesetzt werden, um die Mechanismen von Enzymen, die Regulation von Stoffwechselwegen und die komplexe Verknüpfung mehrerer Stoffwechselwege untereinander zu untersuchen.

Neben den Hemmstoffen des photosynthetischen Elektronentransportes (Literatur u.a. bei Fedtke 1982) rückte in den siebziger und achtziger Jahren eine andere, sehr heterogene Gruppe von Herbiziden in den Vordergrund des Interesses, die Hemmstoffe der Biosynthese der essentiellen Aminosäuren. Zuerst war es Glyphosat, das 1971 von der Firma Monsanto Agricultural Products unter dem Handelsnamen "Roundup" auf den Markt gebracht wurde, und ein Hemmstoff der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren ist. Die 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat (EPSP) Synthase (EC 2.5.1.19, systematischer Name 3-Phosphoshikimat 1-carboxyvinyltransferase), das sechste Enzym des Shikimatweges, konnte allerdings erst 1980 eindeutig als primärer Wirkungsort des Glyphosats identifiziert werden (Steinrücken und Amrhein, 1980).

Wenige Jahre später begann die Vermarktung einer anderen Gruppe von Herbiziden, der Sulfonylharnstoffe, von der Firma E.I. du Pont de Nemours & Company, Inc.. Fast gleichzeitig konnte als Wirkungsort dieser Herbizide, z.B. Chlorsulfuron oder Sulfometuron-Methyl, die Acetolactat-Synthase identifiziert werden. Es ist das erste Enzym in der Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin (Levitt et al., 1981; Chaleff und Mauvais, 1984; Ray, 1984; LaRossa und Schloss, 1984; Scheel und Casida, 1985).

Dasselbe Enzym wird interessanterweise auch von Herbiziden ganz anderer chemischer Struktur, den Imidazolinonen inhibiert (Shaner



et al., 1984). Diese sind Produkte der American Cyanamid Company. Schließlich soll auch noch Phosphinotricin (Hoechst AG) erwähnt werden, ein Inhibitor der Glutaminsynthetase (Leason et al., 1982; Donn et al., 1984).

Besondere Bedeutung hat diese Forschungsrichtung auch dadurch erhalten, daß es möglich erscheint, Resistenz vermittelnde Gene aus Bakterien oder analoge Systeme aus Pflanzen mit Hilfe gentechnologischer Methoden in Kulturpflanzen einzubringen und zu exprimieren, wie es in einigen Modellsystemen schon gelungen ist (Comai et al., 1985; Shah et al., 1986).

Im Gegensatz zur konventionellen Züchtungsforschung erscheint dieser Weg direkter, effektiver und erfolgversprechender zu sein, um bestimmte Kulturpflanzen gegen Breitbandherbizide wie Glyphosat resistent zu machen. Dabei darf nicht übersehen werden, daß Voraussetzung für solche Arbeiten genaue Kenntnisse der enzymatischen und molekularbiologischen Grundlagen der Herbizidresistenz ist.

Mehr Grundlagenwissen über die biochemischen Ursachen für Herbizidresistenz könnte andererseits dazu dienen, traditionelle Screeningverfahren, teure und zeitaufwendige Tests von tausenden von eventuell herbiziden Wirkstoffen, abzulösen durch gezieltere Verbesserungen vorhandener und planvollere Entwicklung neuer Herbizide.

Die vorliegende Arbeit wird sich vor allem mit den molekularen und biochemischen Grundlagen der Glyphosat-Toleranz bei einer pflanzlichen Zellkultur befassen.

Die fundamentale Bedeutung des Shikimisäureweges (Abb.1), der nur bei Mikroorganismen und Pflanzen vorkommt, basiert auf der Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Haslam, 1974). Zusätzlich werden weitere aromatische Verbindungen wie p-Aminobenzoesäure, Ubichinon und Vitamin K aus Intermediaten hergestellt (Gibson und Pittard, 1968). Bei Pflanzen dient er zusätzlich zur Synthese von Lignin, den Phenylpropanen, einer Reihe von Alkaloiden und vielen weiteren sekundären Pflanzenstoffen. Durch die Synthese all dieser Verbindungen durchlaufen große Mengen des von der Pflanze fixierten Kohlendioxids den Shikimatweg (Boudet et al., 1985).

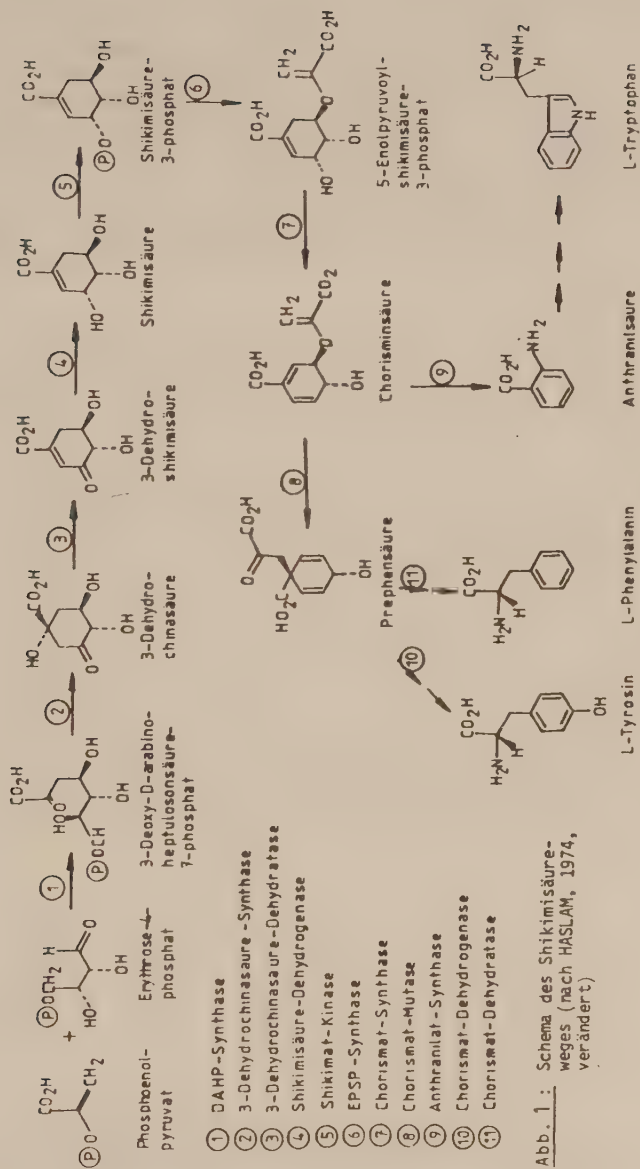


Abb. 1: Schema des Shikimisäureweges (nach HASLAM, 1974, verändert)

Glyphosat, N-(Phosphonomethyl)glycin, wurde 1971 eingeführt und seine herbizide Wirkung erstmals beschrieben (Baird et al., 1971). Eine Reihe von positiven Eigenschaften machten es schnell zu einem sehr erfolgreichen Herbizid. Es wird schnell von Pflanzen aufgenommen und im Phloem transportiert (Sprankle et al., 1975; Gougler und Geiger, 1981). Dabei wird es nicht metabolisiert und entfaltet seine phytotoxischen Eigenschaften in meristematischen Geweben (Haderlie et al., 1979; Ashton und Crafts, 1981). Es wird im Boden schnell abgebaut (Rueppel et al., 1977) und ist wenig toxisch für Säugetiere, Insekten, und Vögel (Franz, 1979). Der wesentlichste Nachteil besteht in der Tatsache, daß Glyphosat als nicht selektives Breitbandherbizid alle behandelten wachsenden Pflanzen vernichtet.

Durch in vivo Versuche mit Mikroorganismen und pflanzlichen Zellkulturen konnte gezeigt werden, daß Glyphosat ein Enzym des Shikimatweges in der Synthesefolge von Shikimat zu Chorismat hemmt.

Daß die EPSP Synthase das Zielenzym von Glyphosat ist, konnte erst durch in vitro Versuche mit dem Bakterium Aerobacter aerogenes (= Klebsiella pneumoniae) eindeutig bewiesen werden (Steinrücken und Amrhein, 1980).

Daraufhin wurden in den folgenden Jahren eine Reihe weiterer EPSP Synthasen aus verschiedenen Mikroorganismen und Pflanzen zumindest partiell gereinigt und näher untersucht: aus E.coli (Lewendon und Coggins, 1983; Duncan et al., 1984), Aerobacter aerogenes (Steinrücken, 1982; Amrhein et al., 1983; Steinrücken und Amrhein, 1984), aus dem Ascomyceten Neurospora crassa (Boocock und Coggins, 1983) und aus Zellkulturen von Corydalis sempervirens (Leifeld, 1982; Johanning, 1983), Nicotiana glauca (Rubin et al., 1984), Petunia hybrida (Steinrücken et al., 1986) und Fagopyrum esculentum (Holländer-Czytko, 1986).

Einige Untersuchungen wurden sehr erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht durch Genklonierungs- und Sequenzierungsmethoden und durch die Überexpression der korrespondierenden Enzyme (Rogers et al., 1983; Duncan et al., 1984; Stalker et al., 1985).

So klonierten Rogers et al. das aroA Gen, welches die EPSP Synthase kodiert, und transformierten E.coli Stämme mit einem Multicopyplasmid, das diese Gene trug, wodurch eine Überproduktion der EPSP Synthase erreicht wurde. Dadurch konnte das Enzym in Grammengen isoliert und gereinigt werden (Rogers et al., 1983).

Mit Ausnahme der EPSP Synthase von Neurospora crassa, die Teil des pentafunktionalen arom-Komplexes ist (Lumsden und Coggins, 1977 und 1978), sind alle anderen EPSP Synthasen monofunktionale, monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von ca. 45000 D.

46200 D (= 427 Aminosäuren) beträgt das Molekulargewicht der EPSP Synthasen von E.coli (Duncan et al., 1984) und Salmonella typhimurium (Stalker et al., 1985). Dies ergab sich aus der Bestimmung der Nukleotidsequenz des entsprechenden aroA Gens und der damit bestimmten Aminosäuresequenz des Enzyms.

In allen untersuchten Fällen war die EPSP Synthase durch Glyphosat in mikromolaren Konzentrationen hemmbar. Aufgrund kinetischer Messungen erwies sich diese Hemmung immer als kompetitiv bezüglich PEP, während bezüglich S3P eine unkompetitive Hemmung bei E.coli (Lewendon und Coggins, 1983), Neurospora crassa (Boocock und Coggins, 1983) und Nicotiana sylvestris (Rubin et al., 1984) gefunden wurde.

Diese Befunde implizieren einen geordneten, sequentiellen Mechanismus der Substratanlagerung, wobei zunächst S3P an das Enzym binden muß und erst dieser Enzym*S3P Komplex PEP oder Glyphosat binden kann.

Gegen einen solchen Mechanismus sprechen Ergebnisse von Steinrücken, der eine Hemmung der Inaktivierung der EPSP Synthase durch alkylierende Agentien auch in Anwesenheit von Glyphosat allein beobachtete, was auf eine Bindung von Glyphosat ohne vorausgehende Bindung von S3P schließen ließ. Deshalb wurde ein Zufallsmechanismus für die Substratanlagerung gefordert (Steinrücken und Amrhein, 1984b).

Neueste kinetische Untersuchungen und Bindungsstudien bestätigen diesen Zufallsmechanismus (Stepanek, 1986).

Die EPSP Synthase überträgt den intakten Enolpyruvylrest des PEP auf die 5'-OH Gruppe des S3P. Als Mechanismus hierfür wurde eine reversible Additions/Eliminierungsreaktion (Abb.2) vorgeschlagen (Levin und Sprinson, 1964) und durch weitere Ergebnisse gestützt (Bondinell et al., 1971; Grimshaw et al., 1982).

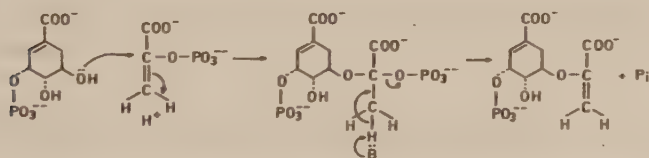


Abb.2. Postulierter Mechanismus der EPSP Synthase Reaktion (nach Levin und Sprinson, 1964)

Anton et al. konnten aber zeigen, daß die 5'-OH Gruppe des S3P nicht zur Protonierung des C₂ von PEP erforderlich ist, da di-deoxy-S3P, das weder die OH-Gruppe in 4'- noch in 5'-Stellung besitzt, auch wie S3P selbst einen Protonenaustausch am C₂ von PEP bewirkt. Sie postulierten einen Enzym*PEP Komplex, der bei Anwesenheit von S3P oder dd-S3P protoniert vorliegt, und dessen positive Ladung am C₂ des PEP durch eine negative Ladung des Enzyms stabilisiert wird (Anton et al., 1983).

Es wurde vorgeschlagen, daß Glyphosat als "transition-state" Analogon (Übergangszustandsanalogon) von PEP wirkt, wobei die positive Ladung der Iminogruppe des Glyphosat die positive Ladung am C₂ des PEP im Übergangszustand simuliert (Abb.3) (Anton et al., 1983; Steinrücken und Amrhein, 1984b). Da Glyphosat kein einfaches Strukturanalogon von PEP ist, wird verständlich, warum kein anderes untersuchtes PEP umsetzendes Enzym durch Glyphosat hemmbar ist (Steinrücken und Amrhein, 1984b).

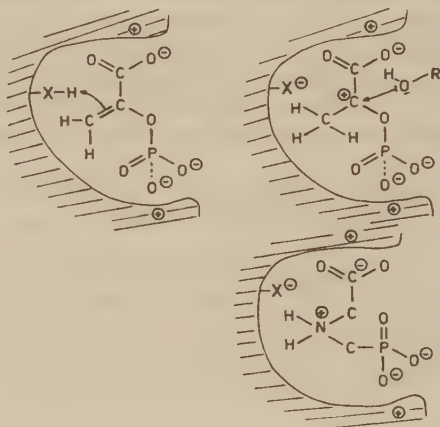


Abb.3 Modell der Bindung von PEP und Glyphosat im aktiven Zentrum der EPSP Synthase (nach Steinrücken und Amrhein, 1984b)

Die durch die Hemmung der EPSP Synthase bedingte Wachstumshemmung kann aber in einigen Fällen von verschiedenen Organismen überwunden werden.

Auf zellulärer Basis kann von einem Organismus Herbizidtoleranz erworben werden durch Verminderung der Aufnahme des Herbizids, durch Metabolisierung desselben zu einem nicht toxischen Abbau-

produkt oder Konjugat, oder, bei kompetitiver Inhibition, durch metabolische Resistenz, das heißt durch Erhöhung der Konzentration des Substrates, welches mit dem Inhibitor um dieselbe Enzymbindungsstelle kompetiert (siehe zum letzten Punkt: Christopherson und Duggleby, 1983).

Zwei weitere, direkt das Zielenzym betreffende, Mechanismen sind denkbar: einerseits die mutagene Veränderung des Enzyms, das dadurch weniger sensitiv gegenüber dem Herbizid wird, oder andererseits die Überproduktion des Targetenzyms durch Genamplifikation, Steigerung der Transkriptions- und/oder Translationsrate, Stabilisierung der m-RNA und/oder des reifen Enzyms, oder eine Kombination dieser möglichen Mechanismen.

Diese beiden letzten, direkt das Zielenzym betreffenden, Mechanismen sind für die Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von Herbiziden besonders interessant.

Glyphosatsensitive EPSP Synthasen fand man bisher nur bei Bakterien und zwar bei Salmonella typhimurium (Comai et al., 1983) und bei Aerobacter aerogenes (Schulz et al., 1984).

Enzymüberakkumulation als Toleranzmechanismus wurde bei einem anderen Stamm von Aerobacter aerogenes nachgewiesen (Amrhein et al., 1983), und Rogers et al. zeigten, daß Amplifikation des aroA Gens von E.coli zur Akkumulation von EPSP Synthase und so zu gesteigerter Glyphosattoleranz führt. Dies ist ein zusätzlicher, eindeutiger Beweis dafür, daß die Hemmung der EPSP Synthase der primäre Wirkungsort von Glyphosat ist (Rogers et al., 1983). Bei Pflanzen sind keine glyphosatsensitiven EPSP Synthasen beschrieben. Bei allen untersuchten glyphosatsensitiven pflanzlichen Zellkulturen wurde als Mechanismus der Glyphosattoleranz eine Überproduktion von sensitiver EPSP Synthase festgestellt, so bei Corydalis sempervirens (Amrhein et al., 1983; Smart et al., 1985), Daucus carota (Nafziger et al., 1984), Petunia hybrida (Steinrücken et al., 1986) und Fagopyrum esculentum (Holländer-Czytko, 1986).

Überproduktion des Zielenzyms als Toleranzmechanismus gegenüber einem Inhibitor, ist vor allem bei Säugerzellkulturen häufig beschrieben und gut untersucht worden (zusammenfassende Darstellung: Stark und Wahl, 1984). Die Überproduktion des Enzyms beruht in vielen Fällen auf einer Genamplifikation, das heißt auf der Vermehrung der Menge an Genkopien, die das entsprechende Enzym kodieren (Schimke, 1982; Stark und Wahl, 1984).

Allerdings gibt es einige Berichte, denen zufolge Enzymüberproduktion auch durch andere Mechanismen erreicht werden kann: durch Veränderung der Transkriptionsregulation (Su et al., 1981), veränderte Translationsraten (Persson et al., 1985) oder auch durch

mehrere verschiedene Mechanismen, die gleichzeitig bei einem Stamm wirksam sind (McConlogue et al., 1986).

Bei pflanzlichen Zellkulturen sind einige Beispiele für Enzymüberproduktion als Mechanismus zur Erreichung von Toleranz gegen bestimmte Inhibitoren beschrieben worden (Ohya, 1976; Shimamoto und Nelson, 1981; Yamaya und Filner, 1981).

Genamplifikation als Basis der Überproduktion des entsprechenden Targetenzyms wurde in zwei Fällen bei pflanzlichen Zellkulturen beschrieben. Für phosphinotricinresistente Luzerne Zellkulturen, die Glutaminsynthetase akkumulieren (Donn et al., 1984) und für glyphosatresistente Petunia hybrida Kulturen, die EPSP Syntase überproduzieren (Shah et al., 1986).

Folgende grundlegende Kenntnisse über die Wirkung von Glyphosat auf das Wachstum von Corydalis sempervirens Zellkulturen und die EPSP Synthase dieser Kulturen waren vor Beginn dieser Arbeit bekannt (Leifeld, 1982; Johanning, 1983; Amrhein et al., 1982 und 1983):

Glyphosattolerante Kulturen wachsen auf glyphosathaltigem Medium langsamer als sensitive Kulturen auf Medium ohne Inhibitor. Die EPSP Syntase Aktivität ist in toleranten Zellen in Gegenwart von Glyphosat bis zu 30 mal höher als in sensitiven bei Abwesenheit des Inhibitors, und tolerante akkumulieren unter diesen Bedingungen bis zum 100-fachen mehr Shikimat als sensitive.

Die partiell gereinigten Enzyme sind praktisch identisch im Bezug auf folgende Parameter: Temperaturoptimum, Aktivierungsenergie, pH-Optimum und I_{50} für Glyphosat. Erste kinetische Untersuchungen zeigten K_m -Werte für S3P und PEP, die bei beiden Enzympräparationen in der gleichen Größenordnung lagen und übereinstimmend konnte jeweils kompetitive Hemmung der EPSP Syntase durch Glyphosat bezüglich PEP festgestellt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Identität der Enzyme aus glyphosatsensitiven und toleranten Kulturen zu verifizieren und die biochemischen und molekularen Grundlagen der Glyphosattoleranz in diesem System zu untersuchen.

II. Material und Methoden

1. Zellkulturen

Die Gewinnung und Erhaltung der Zellsuspensionskulturen von Corydalis sempervirens Pers. und die Selektion der glyphosatadaptierten Kulturen, die in 5 mM Glyphosat im Medium wachsen konnten, wurden schon von Amrhein et al. (1983) beschrieben.

Die Kulturen wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 70 ml LS-Medium (Linsmaier und Skoog, 1965), das im Falle der adaptierten Kulturen 5 mM Glyphosat enthielt, angezogen und jeweils in der späten logarithmischen Phase des Wachstums in frisches Medium überführt. Als Ausgangsmaterial für alle Versuche, ausgenommen der Wachstumskinetiken, dienten Zellen aus der mittleren logarithmischen Phase des Wachstums der Kulturen.

Das Frischgewicht der Kulturen wurde im ungeöffneten Kolben nach der Methode von Gilsson et al. (1983) abgeschätzt und endgültig durch Auswiegen bestimmt, nachdem die Zellen auf einem Büchnertrichter abgenutscht worden waren.

2. Chemikalien

2.1. Radiochemikalien

γ - 32 P ATP (111 TBq/mmol) wurde von Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

2.2. Feinchemikalien

Glyphosat (analytical grade) wurde von Monsanto Agricultural Products Company, St. Louis, MO zur Verfügung gestellt. Alle anderen Fein- und Biochemikalien wurden in bestmöglicher Reinheit von verschiedenen Firmen bezogen. Die Chemikalien sind mit Herstellerangabe im Text angegeben.

2.3. Shikimisäure-3-Phosphat (S3P)

S3P produzierende Aerobaceter aerogenes ATCC 25597 wurden in einem 20 l-Fermenter angezogen und das S3P aus dem Kulturmedium nach der Methode von Knowles und Sprinson (1970) isoliert und gereinigt. Es wurden so 9,6 g S3P als Bariumsalz erhalten.

Das Bariumsalz des S3P wurde, wie bei Steinrücken (1982) beschrieben, in das Natriumsalz überführt und in dieser Form verwendet.

Die Reinheit des isolierten S3P wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Lichrosorb-NH₂, 5µ (Merck) überprüft.

Dazu wurde das S3P durch Phosphatasebehandlung vollständig in Shikimisäure überführt und als solches analysiert (Holländer-Czytko und Amrhein, 1983).

Mit authentischer Shikimisäure (Roth) als Referenzsubstanz wurde die Reinheit der S3P Präparation mit 94% bestimmt.

2.4. 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat (EPSP)

EPSP, das nach einer Methode von Knowles et al. (1970) synthetisiert worden war, wurde freundlicherweise von Herrn Sven Bülow zur Verfügung gestellt.

3. Bestimmung von Shikimisäure und S3P

Die Bestimmung des Shikimisäure- und S3P-Gehaltes der pflanzlichen Kulturen wurde durch HPLC nach methanolischer Extraktion der Zellen durchgeführt (Holländer-Czytko und Amrhein, 1983). Die Bestimmung des Gehaltes im Kulturmedium erfolgte nach der gleichen Methode ohne weitere Reinigung der Proben.

4. EPSP Synthase-Extraktion und Reinigung

Alle Arbeitsschritte wurden bei +4°C durchgeführt.

Das abgenutzte Zellmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Bedarfsfall kurzzeitig (maximal eine Woche) bei -20°C gelagert.

Zur Reinigung der EPSP Synthase wurden 200-250 g der glyphosat-adaptierten bzw. 500-600 g der nicht adaptierten Zellen in das dreifache Volumen des Aufschlußpuffers (0,2 M Iris/HCl pH 7,8; 5 mM EDTA; 50 mM 2-ME und 10% (w/w) Polyclar AT (Sigma)) gegeben. Nach dem Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde die Suspension 45 Minuten im Eisbad gerührt.

Nach Filtration durch vier Lagen Verbandmull wurde der Extrakt 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (45-65% Sättigung) unterzogen und 20 Minuten bei 25000 x g zentrifugiert. Das gefällte Protein wurde

mit 10-15 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7,8; 50 mM 2-ME) resuspendiert und anschließend mit zwei alternativen Methoden gereinigt.

4.1. Die konventionelle Reinigung

Der Extrakt wurde auf eine mit Puffer B (0,2 M Tris/HCl pH 7,8; 50 mM 2-ME und 0,1 M KCl) äquilibrierte Sephacryl S-200 (Pharmacia)-Säule (2,4 x 110 cm) aufgegeben und mit demselben Puffer bei einer konstanten Flußrate von 0,5 ml/min. eluiert.

Alle Fraktionen, die EPSP Synthase Aktivität zeigten, wurden vereinigt und einer vollständigen Ammoniumsulfatfällung (0-80% Sättigung) unterworfen. Das Pellet wurde in etwa 20 ml Puffer A resuspendiert und mit Hilfe einer Sephadex G-25 (Pharmacia)-Säule (5 x 25 cm), die mit Puffer A äquilibriert war, entsalzt.

Alle Protein beinhaltenen Fraktionen wurden auf eine mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Cellulose (DE-52 von Whatman)-Säule (1,4 x 20 cm) mit einer Flußrate von 1,0 ml/min. aufgegeben und, nachdem kein Protein mehr von der Säule gewaschen werden konnte, mit einem linearen KCl-Gradienten (1000 ml; 0-0,2 M KCl) bei der gleichen Flußrate eluiert.

Die Fraktionen mit hoher spezifischer EPSP Synthase Aktivität wurden vereinigt.

Die Enzymaktivität war allerdings nicht stabil und konnte auch trotz Variation der Lagerungsbedingungen (Temperatur, Puffer-substanz und Zusatz von Glycerin und reduzierenden Reagenzien) nicht stabilisiert werden. Die Halbwertszeit der Aktivitätsabnahme unter optimalen Bedingungen (+4°C) betrug etwa 48 Stunden.

4.2. Die affinitätschromatographische Reinigung

Das nach der Ammoniumsulfatfällung in Puffer A resuspendierte Protein wurde anschließend über Nacht gegen 5 l Puffer A dialysiert.

Das Dialysat wurde über eine Sephadex G-25 Säule (5 x 25 cm), die mit 10 mM 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES, Sigma) pH 6,5; 10 mM Glutathion (reduziert); 10% Glycerin (v/v); 0,1 mM EDTA und 10 µM Na-Wolframat (Puffer C) äquilibriert worden war, vollständig entsalzt (Leitfähigkeit unter 1 mS) und umgepuffert.

Alle proteinhaltigen Fraktionen wurden mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. auf eine Phosphocellulose (Whatman)-Säule (1,4 x 20 cm) aufgebracht. Die Säule war vorher mit Puffer C äquilibriert

worden und wurde nach Aufbringung des Proteins mit Puffer C solange gewaschen (Flußrate 1,0-1,5 ml/min.), bis kein Protein im Eluat mehr nachweisbar war.

Danach wurde die Flußrate auf 0,5 ml/min. herabgesetzt und die EPSP Synthase spezifisch mit 20 ml 0,1 mM S3P und 0,1 mM Glyphosat in Puffer C eluiert.

Nach diesem Reinigungsschritt war die EPSP Synthase bei -20°C lagerbar und in ihrer Aktivität mindestens über 6 Monate lang stabil.

Diese Methode wurde zur Reinigung der EPSP Synthase aus nicht adaptierten Kulturen folgendermaßen abgewandelt:

Nach der Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen 5 l Puffer A wurde das Dialysat auf einer Sephadex G-25 Säule (5 x 25 cm), die mit Puffer A äquilibriert war, vollständig entsalzt.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden einer DEAE-Cellulose Chromatographie unterzogen. Dabei wurde vorgegangen wie in Abschnitt II.4.1. beschrieben.

Die Fraktionen mit EPSP Synthase Aktivität wurden vereinigt und zur Volumenreduktion eine Ammoniumsulfatfällung (0-80%) durchgeführt. Das Pellet wurde mit 10-15 ml Puffer C resuspendiert und über eine Sephadex G-25 Säule (5 x 25 cm), die mit Puffer C äquilibriert war, entsalzt (Leitfähigkeit unter 1 mS) und umgepuffert.

Danach wurde genauso verfahren wie bei der Reinigung des Enzyms aus den glyphosatadaptierten Kulturen.

Auch hier war die Aktivität der EPSP Synthase während der Lagerung bei -20°C stabil.

5. Enzymmessungen

5.1. Die EPSP Synthase

Die EPSP Synthase Aktivität wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

5.1.1. Der Phosphatetest

Die Bestimmung des durch die EPSP Synthase freigesetzten anorganischen Phosphats erfolgte prinzipiell nach der Methode von Lanzetta et al. (1979). Die Durchführung der Tests erfolgte wie bei Steinrücken und Amrhein (1984a) beschrieben, allerdings mit einigen Änderungen:

- Als Puffer im Testansatz wurde Tris/Maleat pH 7,8 verwendet.
- Die Substratkonzentrationen im Testansatz betrugen 1 mM.
- Als Nullwertkontrollen wurden Ansätze hergestellt, deren EPSP Synthase Aktivität durch Zugabe von 10 mM Glyphosat vollständig gehemmt war.
- Bei der Bestimmung der EPSP Synthase Aktivität in Rohextrakten der nicht adaptierten Kultur wurde die Phosphatase Aktivität durch Zugabe von 20 μ M Na-Wolframat deutlich reduziert.

5.1.2. Der gekoppelte optische Test

Für die kinetischen Untersuchungen mit gereinigter EPSP Synthase wurde die durch die Reaktion hervorgerufene Bildung von EPSP an die Chorismat Synthase Reaktion gekoppelt (Boocock und Coggins, 1983; Mousdale und Coggins, 1984).

Die Ansätze enthielten 50 mM Triethanolamin/HCl pH 7,8; 50 mM KCl; 2,5 mM $MgCl_2$; 50 μ M NADPH; 10 μ M FMN; 1 mM S3P; 1 mM PEP; 92 pkat angereicherte Chorismat Synthase von Neurospora crassa (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herr Sven Bülow) und 20-30 pkat gereinigte EPSP Synthase in einem Gesamtvolumen von 0,6 ml.

Nach 10 minütiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von PEP gestartet und der Reaktionsverlauf bei 274 nm verfolgt.

5.2. Messungen der Markerenzyme

Bei den Versuchen zur subzellulären Lokalisierung der EPSP Synthase in C.sempervirens Zellkulturen wurden als Leitenzyme bestimmt:

- Katalase, nach der Methode von Chance und Maehly (1955)
- Triosephosphat Isomerase, nach der Methode von Beisenherz (1955)
- Phosphoenolpyruvat Carboxylase, nach der Methode von Maruyama (1966)
- Als Marker für die Mitochondrien wurde ihre durch Cyanid hemmbare Fähigkeit zur NADH Oxidation gemessen.

6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt.

Zur Standardisierung wurde Rinderserumalbumin (BSA, Serva) verwendet. Hierbei wurde eine Extinktionsdifferenz von 0,1 durch 2,5 µg BSA hervorgerufen.

Im Rahmen der Versuche zur SH-Gruppenbestimmung der EPSP Synthase wurde allerdings eine Standardisierung mit der gereinigten EPSP Synthase aus C. sempervirens durchgeführt.

Dazu wurde das Enzym affinitätschromatographisch gereinigt, mehrfach gegen Wasser dialysiert und schließlich lyophilisiert. Eine Extinktionsdifferenz von 0,1 wurde in diesem Fall durch 10,6 µg EPSP Synthase hervorgerufen.

7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

7.1. Unter denaturierenden Bedingungen

SDS Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden nach der Methode von Lämmli (1970) durchgeführt. Es wurden 1,5 mm Flachbettgele (10 x 13 cm) verwendet.

Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung wurden entweder der "Low Molecular Weight Electrophoreses Calibration Kit" (Pharmacia) oder eine eigene Mischung von Eichproteinen (Sigma) benutzt.

Die Anfärbung der Proteine erfolgte durch Verwendung von Serva Blau R in der Färbelösung.

7.2. Unter nativen Bedingungen

Diese Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden ebenfalls in 1,5 mm dicken Flachbettgelen (10 x 13 cm) durchgeführt. Dabei wurde nach der Methode von Maurer (1968) vorgegangen.

Nach der Elektrophorese erfolgte der Nachweis der EPSP Synthase im Gel nach der Methode von Nimmo und Nimmo (1982). Dazu wurde das Gel zunächst für 30 Minuten in Inkubationpuffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,8; 50 mM 2-ME) belassen und anschließend in demselben Puffer mit 1 mM PEP; 1 mM S3P und 100 mM CaCl₂ bei 37°C 16 bis 24 Stunden inkubiert.

Das durch die Reaktion freigesetzte Phosphat fiel unter diesen

Bedingungen als schwerlösliches CaHPO_4 aus und war im Gel als weißer Niederschlag leicht identifizierbar.

8. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht der nativen EPSP Synthase wurde durch Gelfiltration an Sephacryl S-200 (Pharmacia) in einer $2,4 \times 110$ cm Säule bestimmt. Das Säulenmaterial wurde mit Puffer D (0,25 M Tris/HCl pH 7,8; 0,1 M KCl und 50 mM 2-ME) äquilibriert. Die affinitätsgereinigte EPSP Synthase (120 nkat) wurde mit je 2 mg der folgenden Markerproteine zusammen in 10 ml Puffer D gelöst: Cytochrom C (MG 12400 D), Carboanhydrase (MG 29000 D), Hühnerserumalbumin (MG 45000 D), Rinderserumalbumin (66000 D) und Alkohol Dehydrogenase (150000 D).

Zusätzlich wurde Blue Dextran zugegeben.

Die Säule wurde mit Puffer D bei einer konstanten Flußrate von 0,2 ml/min. eluiert. Die EPSP Synthase wurde anhand ihrer Aktivität im Phosphatetest, die anderen Proteine mit dem Bradford-Proteintest identifiziert.

Die wiedergefundene Gesamtaktivität der EPSP Synthase betrug in beiden Versuchen mit gereinigtem Enzym aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen jeweils etwa 60% der Ausgangsaktivität.

9. Chromatofokussierung

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der gereinigten EPSP Synthase wurde durch Chromatofokussierung mit Polybuffer Exchanger 94 (Pharmacia) durchgeführt.

Die affinitätschromatographisch gereinigte EPSP Synthase wurde über Nacht gegen 25 mM Imidazol/HCl pH 7,8 und 50 mM 2-ME dialysiert. Mit diesem Puffer wurde auch die Säule ($0,8 \times 14$ cm) zuvor äquilibriert.

Nach dem Auftragen der Probe mit einer Flußrate von 1 ml/min. wurde mit Polybuffer 74 (1:8 verdünnt und mit HCl auf pH 4,0 eingestellt) und 50 mM 2-ME eluiert.

In dem pH-Gradienten, der sich zwischen pH 7,0 und pH 4,0 ausbildet, eluieren die Proteine bei demjenigen pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, da dort die Gesamtnettoladung des Proteins gleich Null ist.

Jede Fraktion wurde nach Messung des pH-Wertes sofort auf pH 7,8 eingestellt und später auf ihre EPSP Synthase Aktivität getestet.

10. Immunologische Methoden

10.1. Immunisierung und Gewinnung der Antiseren

Die polyklonalen Antiseren wurden aus Kaninchen entsprechend der Methode von Weiler und Zenk (1976) gewonnen.

Die gereinigte EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten C.sempervirens Zellkulturen wurde gegen IBS Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4 und 0,9% NaCl (w/v)) dialysiert, mit dem gleichen Volumen von kompletten Freund'schen Adjuvanz (Sigma) versetzt und durch Ultraschallbehandlung emulgiert.

Durch Injektion von etwa 50 µg der so emulgierten EPSP Synthase in die Rückenhaut der Kaninchen (viermal im Abstand von jeweils einer Woche) wurde eine Vorimmunisierung der Tiere erreicht. Danach wurden im Abstand von jeweils vier Wochen die Hauptimmunisierungen ("boost"-Immunisierungen) durch Injektion von 50 µg der emulgierten EPSP Synthase in die Hinterlaufsmuskulatur durchgeführt.

Jeweils 7 und 14 Tage nach jeder Hauptimmunisierung wurden den Kaninchen etwa 30 ml Blut aus der rechten Ohrvene entnommen. Nach Bildung und Absetzen des Blutkuchens wurde das Serum durch Zentrifugation erhalten.

10.2. Der Doppelimmuno-Diffusionstest

Die Doppelimmuno-Diffusionstests nach Ouchterlony (1949) wurden auf Objektträgern (2,6 x 7,6 cm) in 0,8% (w/v) Agarose in 20 mM Na-Barbiturat Puffer pH 8,6 durchgeführt.

Die Zeitdauer bis zur Beendigung der Diffusion und Präzipitation betrug etwa 24 Stunden.

10.3. Western Blot

Die Polyacrylamidgele wurden zunächst 30 Minuten in Blot Puffer (192 mM Glycin; 20 mM Tris/HCl pH 8,3) inkubiert und danach durch Elektrophorese (250 mA, 120 Minuten) aus dem Gel auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, BA 85, Porenweite 0,45 µm) übertragen.

Die freigebliebenen Bindungsstellen auf der Nitrocellulosefolie wurden mit BSA (3% (w/v) BSA in IBS Puffer) blockiert und anschließend wurde die Folie mit dem Antiserum (5-10 ml 1:50 verdünnt mit IBS/3% (w/v) BSA) inkubiert.

Durch mehrfaches Waschen der Folie mit TBS/0,05% (v/v) Nonidet P-40 und TBS allein wurden die überschüssigen Antikörper entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden mit Peroxidase gekoppeltem Protein A (Sigma) markiert (Towbin et al., 1979). Der Nachweis der Peroxidase wurde durch ihre Reaktion mit 4-Chloro-1-Naphthol erreicht (Hawkes et al., 1982).

11. Inaktivierungsversuche

11.1. Inaktivierung mit N-Ethylmaleimid (NEM)

Die affinitätschromatographisch gereinigte EPSP Synthase wurde gegen einen 1000-fachen Überschuß von 10 mM HEPES (Sigma) pH 7,8 dialysiert.

Das Enzym wurde dann bei 30°C in einem Volumen von 0,5 ml in 10 mM HEPES pH 7,8 mit 1mM NEM (Sigma) und in einigen Versuchen zusätzlich mit Substraten der EPSP Synthase oder Glyphosat vorinkubiert.

Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Aliquots entnommen (Dreifachbestimmung) und die EPSP Synthase Aktivität mit dem Phosphattest bestimmt.

Als Kontrolle wurde jeweils auch der Einfluß der Substrate und Glyphosat allein (ohne NEM) auf die Aktivität gemessen, um den 100% Wert der jeweiligen Meßreihe zu bestimmen.

II.11.2. Inaktivierung mit Pyridoxalphosphat (PALP)

Die über eine Phosphocellulose Säule gereinigte EPSP Synthase wurde gegen einen 1000-fachen Überschuß von Triethanolamin (TEA) Puffer pH 8,0 dialysiert.

Die Inkubation mit PALP (Boehringer) erfolgte in 20 mM TEA Puffer pH 8,0 bei 25°C.

Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquots entnommen und in einen 100-fachen Überschuß an 20 mM TEA Puffer pH 6,5 und 50 mM 2-ME überführt, wodurch die Reaktion sofort zum Erliegen kam.

Durch Zugabe von LiBH₄ (1000-facher Überschuß) wurde die entstandene Schiff'sche Base reduziert und damit stabilisiert.

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Reaktion des PALP wurden die Reaktionsgefäße durch Umwickeln mit Alufolie geschützt.

Die Aktivitätsbestimmung der EPSP Synthase erfolgte nach der Stabilisierung des Zwischenproduktes durch den Phosphattest.

12.SH-Gruppenbestimmung

Die quantitative Bestimmung der SH-Gruppen der EPSP Synthase erfolgte in modifizierter Form nach einer Methode von Ellman (1959). Dabei reagiert 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) mit SH-Gruppen unter Bildung von 2-Nitro-5-thiobenzoat Anionen, die bei 412 nm photometrisch nachweisbar sind.

Die Reaktionsansätze enthielten 1ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,0; 100 μ l 10 mM DTNB (Serva) und 750 μ l Probe und unter denaturierenden Bedingungen zusätzlich 6 M Harnstoff (Bethesda Research Laboratories).

Mit Dithioerythrol (DTE, Sigma) wurde eine Eichgerade erstellt und der molare Extinktionskoeffizient als 13700 cm²/mol bestimmt.

Das gereinigte Enzym wurde mehrfach gegen Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 dialysiert (4 mal gegen einen 2500-fachen Pufferüberschuß unter permanenter Stickstoffbegasung).

Die Reaktion selbst war lichtempfindlich und wurde daher in abgedunkelten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Zunahme der Extinktion wurde bis zum Erreichen einer konstanten optischen Dichte verfolgt.

Die verwendete Harnstofflösung wurde über einem Mischbett-Ionenaustauscher täglich frisch angesetzt und alle Lösungen wurden vor Benutzung mit Stickstoff begast.

Die Reaktion wurde in Plastikküvetten unter Stickstoffbegasung durchgeführt.

13.Subzelluläre Lokalisierung der EPSP Synthase

Das verwendete Material waren C.sempervirens Zellkulturen aus der logarithmischen Phase des Wachstums, die nach einer modifizierten Methode von Feierabend und Brassel (1977) behandelt wurden.

Das Zellmaterial wurde auf einem Büchnertrichter abgenutscht, mit Homogenisiermedium (0,45 M Saccharose; 0,15 M Tricin/KOH pH 7,5; 1 mM EDTA; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 10 mM Cystein und 0,01% (w/v) BSA) zu gleichen Teilen versetzt und in einem Gemüsezerkleinerer 4 x 1 min. gehackt. Das Homogenat wurde durch Mull gepreßt, auf einen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet und 3 Stunden bei +4°C und 55000 x g in einer Ultrazentrifuge (Kontron TGA-50, Rotor IST 28) zentrifugiert.

Die linearen Saccharose-Dichtegradienten wurden mit einer Mischkammer (2 x 50 ml) hergestellt. Die beiden Lösungen enthielten 30 und 60% (w/v) Saccharose in 10 mM Tricin/KOH pH 7,5; 5 mM EDTA;

5 mM $MgSO_4$. Zusätzlich wurde dieser Gradient mit einem kleinen Volumen 28%iger Saccharose in demselben Puffer überschichtet.

Die Fraktionierung der zentrifugierten Gradienten erfolgte durch Unterschichten mit 65%iger Saccharoselösung mit einem Dichtegradienten-Fraktionator (ISCO Modell 185) bei einer Flußrate von 0,8 ml/min.. Das Fraktionsvolumen betrug jeweils 1 ml.

14. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie der EPSP Synthase

Es wurde die Anionenaustauschersäule Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) verwendet, deren maximale Kapazität bei guter Trennleistung etwa 5 mg Protein betrug.

Folgende Geräte wurden benutzt:

- LKB 2150 HPLC Pumpe
- LKB 2152 HPLC Controller
- LKB 2150 Detector
- LKB 22100 Recorder

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Flußrate betrug 1 ml/min. bei 15-20 bar Gegendruck.

Die Laufpuffer wurden durch permanente Zufuhr von Helium entgast und alle Proben vor ihrer Aufgabe auf die Säule durch ein 0,22 μm Cellulose Sterilfilter (Millipore) filtriert.

Die Enzympräparationen wurden zunächst gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,2; 50 mM 2-ME dialysiert und dann auf die Säule, die mit 10 mM Tris/HCl pH 7,2 äquilibriert war, aufgegeben und mit einem KCl-Gradienten von 0-1,5 M KCl eluiert. Der Proteingehalt wurde automatisch anhand der OD 280 nm registriert. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen im Eisbad aufgefangen, wobei in jedem Gläschen 0,1 ml 0,5 M 2-ME vorgegeben worden waren.

Anschließend wurde die EPSP Synthase Aktivität der einzelnen Fractionen mit dem Phosphatetest bestimmt.

15. PTC-Aminosäureanalyse

Affinitätschromatographisch gereinigte EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten C. sempervirens Zellkulturen wurde gemäß II.14. an Mono Q chromatographiert und die Reinheit der aufgefangenen Fractionen durch Bestimmung der spezifischen Aktivität und durch SDS-Gelelektrophorese überprüft.

Die am besten geeignete Fraction wurde von Dr. H. Meyer, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät der Ruhr Univer-

sität Bochum analysiert.

Das mit Säure gefällte und anschließend getrocknete Enzym wurde 24 Stunden in 6 M HCl im Vakuum bei 110°C hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden nach der Methode von Heinrikson und Meredith (1984) als ihre Phenylthiocarbamoyl-Derivate dargestellt.

Ihre Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung wurde durch HPLC an Spherisorb ODS III (3 µm) erreicht.

16. Sequenzierung des N-terminalen Endes der EPSP Synthase

Die hierbei verwendete EPSP Synthase Probe war dieselbe wie bei der PTC-Aminosäureanalyse (II.15.), also affinitätschromatographisch gereinigt und an Mono Q chromatographiert.

Die Sequenzierung des N-terminalen Endes des Enzyms wurde basierend auf der Methode von Hewick et al. (1981) mit einigen Änderungen durchgeführt, wie sie bei Tarr (1985) beschrieben sind. Etwa 1 nmol des gereinigten Enzyms wurden in Polybrene (Pierce) eingebettet und getrocknet.

Danach wurde Phenylisothiocyanat (PITC, Beckman) an die N-terminale Aminosäure gekoppelt und so das Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Derivat hergestellt.

Nach einem Waschschriff wurde durch Säurezugabe die endständige, derivatisierte Aminosäure als Anilinothiazolinon (ATZ)-Derivat vom Restpeptid abgespalten, stabilisiert und extrahiert.

Durch Ansäuern mit HCl und Erhitzen der Probe fand eine Konversion des ATZ-Derivates zum Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivat statt.

Dieses wurde nach Trocknung in Acetonitril gelöst und in einem HPLC System über eine Chromatopac C-R3A Säule aufgetrennt und identifiziert.

Das Restpeptid wurde automatisch einem neuen Sequenzierungszyklus unterzogen.

Auf diese Weise konnten die ersten 26 Aminosäuren des N-terminalen Endes der EPSP Synthase aus C.sempervirens identifiziert werden.

Diese Versuche wurden ebenfalls von Dr. H. Meyer, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät der Ruhr Universität Bochum durchgeführt.

17. DNA Isolierung und genetische Analysen

17.1. DNA Isolierung

Die Isolierung und Reinigung hochmolekularer DNA aus den C.sem-pervirens Zellkulturen erfolgte nach der Methode von Murray und Thompson (1980).

Kulturen aus der logarithmischen Phase des Wachstums wurden auf einem Büchnertrichter abgenutscht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

Die DNA Isolierung erfolgte bei Raumtemperatur; alle Glasgeräte wurden vor Benutzung silikonisiert und alle Lösungen und Geräte sterilisiert.

1 g der gefriergetrockneten Zellen wurde zu einem feinen Pulver gemörst und in 15 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,7 M NaCl; 10 mM EDTA; 1% (w/v) Cethyl-trimethyl-ammoniumbromid (CTAB, Sigma) und 1% (v/v) 2-ME) vorsichtig suspendiert.

Dann 20 Minuten bei 56°C inkubiert und anschließend zweimal mit je 15 ml Chloroform/Octanol (24/1, v/v) extrahiert. Eine schnelle Phasentrennung wurde durch 10 minütige Zentrifugation der Proben bei 13000 x g erreicht.

Zur wässrigen Phase wurde 1/10 Volumen 10%iges (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl gegeben und erneut eine Chloroform/Octanol Extraktion durchgeführt.

Dann wurde zur wässrigen Phase ein gleich großes Volumen Präzipitationspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1% (w/v) CTAB) gegeben und nach 30 minütiger Inkubation das Präzipitat aus DNA und CTAB abzentrifugiert.

Das Pellet wurde vorsichtig in 1,8 ml 1 M CsCl (Roth)/Ethidiumbromid (EtBr) (1 M CsCl; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA und 0,2 mg/ml EtBr) resuspendiert und 2,2 ml 7 M CsCl/EtBr (7 M CsCl; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,1% Sarcosyl (Sigma); 0,2 mg/ml EtBr) hinzugefügt.

Dann wurden die Proben in Polyallomer-Röhrchen (Beckman) überführt und 16 Stunden bei 40000 Umdrehungen/min. in einer Ultrazentrifuge (Kontron TGA 50, Rotor SW 56) zentrifugiert.

Die DNA Bande war durch das interkalierte Ethidiumbromid im UV-Licht eindeutig identifizierbar und wurde mit einer Kanüle vorsichtig entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Dieses wurde mit 4,5 M CsCl/EtBr (4,5 M CsCl; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,1% Sarcosyl und 0,2 mg/ml EtBr) gefüllt. Erneut wurde wie oben beschrieben zentrifugiert und die DNA Bande entnommen.

Das Ethidiumbromid wurde durch wiederholte Extraktion mit NaCl

gesättigtem Isopropanol vollständig entfernt, genauso wie anschließend das CsCl durch eine mindestens 24 stündige Dialyse gegen Wasser entfernt wurde.

Die DNA Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (OD 1,0 = 50 µg DNA/ml Probe).

Nach einer Ethanol-Fällung wurde die DNA abzentrifugiert und im Vakuum bei 40°C getrocknet und dann in soviel Wasser aufgenommen, daß eine DNA Konzentration von 1 mg/ml resultierte.

Die Größe der isolierten DNA wurde durch Agarose Gelelektrophorese überprüft und nur solche Präparationen, deren DNA größer oder gleich 20 kB war, wurden für die weiteren Versuche verwendet. Außerdem wurden die DNA Proben nur dann weiter untersucht, wenn ihre Reinheit, ausgedrückt als Quotient OD 260 nm/OD 280 nm, nicht kleiner als 1,7 war.

17.2. Synthese und radioaktive Markierung des 5'-Endes des Oligonukleotids

Die Synthese der benutzten Oligonukleotidfamilie wurde in einem Festphasensystem mit dem DNA Synthesizer Modell 380-A (Applied Biosystems GmbH) gemäß Herstellerangaben freundlicherweise von Dr. Holländer-Czytko durchgeführt.

Die radioaktive Markierung des synthetisierten Oligonukleotids erfolgte durch Phosphorylierung des 5'-Endes mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durch das Enzym T₄-Polynukleotidkinase nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980). Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Oligonukleotid	1,4 µl = 20 pmol
10 x Kinasepuffer	5 µl
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	6 µl = 60 µCi
ATP	4,5 µl = 45 pmol
T ₄ -Polynukleotidkinase	1 µl = 10 U
H ₂ O	7,1 µl

	25 µl

Der Kinasepuffer (10x) enthielt:

0,7 M Tris/HCl pH 7,6

0,1 M MgCl₂

50 mM DIT

1 mM Spermidin

1 mM EDTA

1 mM KCl

Die Inkubation wurde 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und dann durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

Die Abtrennung des überschüssigen γ^{32} -ATP erfolgte wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben durch Chromatographie an Sephadex G-50 (Pharmacia).

Das Säulenmaterial wurde gemäß Herstellerangabe vorbereitet und mit TE Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) äquilibriert. 27 µl Probe wurden auf die Säule (Volumen 1 ml) aufgegeben und mit TE Puffer eluiert. 10 Fraktionen mit je etwa 0,2 ml Volumen wurden aufgefangen und einzeln nach der Cerenkov Methode im Szintillationszähler (BF Betaszint 5000/300, Berthold Friesseke) ausgezählt.

Die Fraktionen des ersten radioaktiven Maximums, welches dem markierten Oligonukleotid entsprach, wurde vereinigt und so in die Hybridisierungsexperimente eingesetzt. Das zweite Maximum entsprach dem überschüssigen freien γ^{32} -ATP und wurde verworfen.

17.3. Restriktion der DNA und Agarose-Gelelektrophorese

Die isolierte hochmolekulare DNA wurde mit drei verschiedenen Restriktions-Endonukleasen: Eco RI, Bam HI und Hind III (alle von Bethesda Research Laboratories) vollständig restringiert.

Dazu wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen (jeweils 5 U pro µg DNA) in geeigneten Puffern (gemäß Herstellerangaben) für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Der Erfolg der Restriktionen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Diese Gelelektrophoresen wurden in 2-3 mm dicken Flachbettgelen (10 x 12 cm) durchgeführt. Als Laufpuffer diente TBE Puffer (0,09 M Tris/Borat pH 8,0; 1 mM EDTA). Als Probenaufgabepuffer (6x) wurde 0,25% Bromphenol-Blau; 40% (w/v) Saccharose in Wasser verwendet (Maniatis et al., 1982).

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in 1%, 0,8%

und 0,5% (w/v) Agarosegelen (in TBE Puffer) bei 60 V Spannung. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde mit Hind III restringierte lambda-DNA als Standard mit aufgetragen. Danach wurde die DNA im Gel 20 Minuten mit 0,5 µg EtBr/ml in TBE Puffer inkubiert (Sharp et al., 1973) und die DNA so im UV-Licht sichtbar gemacht.

17.4.Southern Blot

Die in den Agarosegelen entsprechend ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Methode von Southern (1975) auf eine feste Matrix (Nitrocellulose) transferiert.

Da nur einzelsträngige DNA irreversibel an Nitrocellulose bindet, wurde die DNA zunächst denaturiert, indem das Gel 2 mal je 15 Minuten in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) inkubiert wurde.

Anschließend wurde das Gel neutralisiert, indem es mindestens 2 mal für je 15 Minuten in Neutralisierungspuffer (2 M NaCl; 1 M Tris/HCl pH 8,0) gewaschen wurde.

Im Weiteren wurde so verfahren wie es bei Maniatis et al.(1982) ausführlich beschrieben wurde.

Als Transferpuffer wurde aber 20x SSPE Puffer (0,2 M NaH_2PO_4 /NaOH pH 7,4; 3,6 M NaCl; 20 mM EDTA) verwendet.

Die Transferzeit betrug 16-24 Stunden.

Danach wurde die Folie bei Raumtemperatur getrocknet und die DNA durch 1 stündige Inkubation bei 80°C immobilisiert.

17.5.Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid

Die Hybridisierungen wurden modifiziert nach einer Methode von Davis et al. (1980) durchgeführt.

Die Nitrocellulosefolien wurden zunächst prähybridisiert, indem sie für 4-8 Stunden bei 36°C in Hybridisierungspuffer in einem Schüttler (New Brunswick, Typ G-24) inkubiert wurden.

Der Hybridisierungspuffer enthielt:

4 x SSPE

10 x Denhardt's Lösung

400 µg/ml Heringssperma DNA

4 x SSPE : 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,4; 0,72 M NaCl; 4 mM EDTA

10 x Denhardt's

Lösung : 0,02% (w/v) Ficoll; 0,02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 0,02% (w/v) BSA-Pentax Fraction U in Wasser

Die Hybridisierung erfolgte in demselben Puffer (Hybridisierungspuffer), der zusätzlich radioaktiv markiertes Oligonukleotid ($3-3,5 \times 10^6$ cpm/ml) enthielt.

Die Folien wurden 20-24 Stunden bei 36°C im Schüttler inkubiert. Danach wurden die Folien in 4 x SSPE bei 36°C unter mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen und getrocknet.

Zur Autoradiographie der getrockneten Folien wurden X-Omat AR Röntgenfilme (Kodak) verwendet. Die Expositionsdauer betrug etwa 24 Stunden bei -80°C.

17.6. Dot-Blot Analyse

Die DNA Präparationen wurden durch Ultraschallbehandlung (3 x 15 sec.) gesichert, um kleinere und besser zu transferierende Fragmente für das Blotting auf Nitrocellulosefolie zu erhalten. Durch 10 minütiges Kochen der Proben im Wasserbad wurde die DNA einzelsträngig gemacht und sofort wieder auf 4°C abgekühlt. Verschiedene, definierte Volumina der DNA Proben wurden in einem Dot-Blot Apparat direkt auf Nitrocellulose, die zuvor in 4 x SSPE inkubiert worden war, aufgetragen und durch Unterdruck langsam durch die Folie gesogen. Anschließend wurde mit 4 x SSPE nachgespült.

Die Folie wurde bei Raumtemperatur getrocknet und dann 1 Stunde bei 80°C inkubiert.

Die nachfolgende Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte genau wie in Teil II.17.5. beschrieben.

Zur Quantifizierung des mit der DNA hybridisierten Oligonukleotids wurden die Bereiche gebundener DNA ausgestanzt und in Gläschen mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität der Proben im Zähler gemessen.

Der "background" wurde bestimmt, indem DNA-freie Bereiche der Folie ausgestanzt, gezählt und von den Meßwerten subtrahiert wurden.

III. Ergebnisse

1. Glyphosatwirkung in vivo

1.1. Wachstum von glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Corydalis sempervirens Zellkulturen

C. sempervirens Zellkulturen wurden zur Selektion von Glyphosat-toleranz ausgewählt, da sie relativ hohe spezifische EPSP Syn-thase Aktivitäten besitzen und in Medium ohne zugesetzte Amino-säuren wachsen können. Dies ist wichtig, da gezeigt wurde, daß aromatische Aminosäuren die Wachstumshemmung durch Glyphosat in pflanzlichen Zellkulturen zumindest teilweise aufheben können (Haderlie et al., 1977; Gresshoff, 1979). Dieser Effekt konnte für C. sempervirens ebenfalls gezeigt werden (Smart et al., 1985). Glyphosat in Konzentrationen von 1 mM oder mehr hemmte das Wachs-tum dieser Zellkulturen vollständig, 0,5 mM bewirkte eine starke Wachstumshemmung (Amrhein et al., 1983). Durch schrittweisen Transfer der Kultur in Medien mit steigenden Glyphosatkonzentrationen gelang es, diese an bis zu 10 mM Glypho-sat zu adaptieren. Suspensionskulturen, die an 5 mM Glyphosat adaptiert waren, wurden als Ausgangsmaterial für alle Versuche verwendet. Diese Kulturen tolerierten 100-fach höhere Glyphosat-konzentrationen als sensitive Kulturen, die in glyphosاتفreiem Medium wuchsen (Smart et al., 1985).

Adaptierte Zellkulturen in Medium mit 5 mM Glyphosat zeigten das gleiche Wachstumsverhalten wie nicht adaptierte Kulturen in Me-dium ohne Glyphosat. So war die Wachstumsrate in der logarithmi-schen Phase und auch das Frischgewicht nach Erreichen der statio-nären Phase bei beiden nahezu identisch (Abb. 4A). Im Gegensatz zum dargestellten (Abb. 4A) Versuch zeigte sich in einigen wenigen Kinetiken bei den adaptierten Kulturen eine leicht verlängerte lag-Phase.

Unter den hier gewählten Bedingungen begann bei beiden Kulturen nach einem Zeitraum von 3 bzw. 4 Tagen (lag-Phase) die logarith-mische Phase und das Wachstum ging nach 9 bzw. 10 Tagen in die stationäre Phase über.

Bei der nicht adaptierten Kultur verliefen spezifische Aktivität und Gesamtaktivität nach Eintritt in die logarithmische Phase parallel und hatten ein Maximum etwa in der Mitte dieser Wachs-tumsphase (Abb. 4B).

Bei der adaptierten Kultur zeigte sich im Bezug auf die spezifische

Aktivität kein so ausgeprägtes Maximum, aber die höchste Aktivität wurde um den 9. Tag erreicht, also gegen Ende der logarithmischen Phase. Demgegenüber war die Gesamtaktivität während der gesamten logarithmischen Phase praktisch konstant (Abb. 4C).

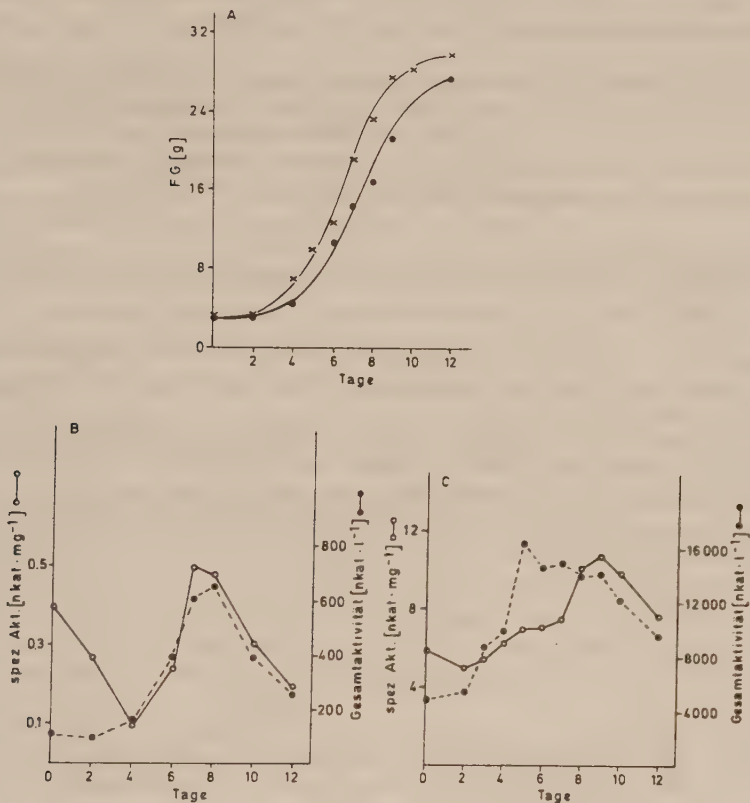


Abb 4 A. Zeitlicher Verlauf des Wachstums der glyphosatadaptierten *C. sempervirens* Kultur in Medium mit 5mM Glyphosat (x—x) und der nicht adaptierten Kultur in Medium ohne Glyphosat (●—●).
 B. Zeitabhängigkeit der Gesamtaktivität (●—●) und der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase (O—O) während des Wachstums der nicht adaptierten Kultur.
 C. Wie B, aber für die adaptierte *C. sempervirens* Kultur. Zu beachten sind die unterschiedlichen Ordinatenmaßstäbe in B und C.

Die Gesamtaktivität der EPSP Synthase der adaptierten Kulturen war bei Vergleich der Maximalwerte etwa 30 mal, die spezifische Aktivität circa 22 mal höher als in sensitiven Kulturen. Die Feststellung einer deutlich erhöhten EPSP Synthase Aktivität, wie auch die Größenordnung dieser Steigerung deckten sich gut mit früheren Untersuchungen (Amrhein et al., 1983).

Da die adaptierten Kulturen in Medium mit 5 mM Glyphosat genauso gut wuchsen wie nicht adaptierte Kulturen in Medium ohne Hemmstoff, wurden sie als optimal angepaßt angesehen und für alle folgenden Versuche verwendet. Die Verdopplungszeit betrug im dargestellten Versuch für beide Kulturen etwa 48 Stunden.

1.2. Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum nicht adaptierter Kulturen

Untersucht werden sollte der Einfluß subletaler Glyphosatkonzentrationen (0,5 mM) auf Wachstum und EPSP Synthase Aktivität nicht adaptierter Kulturen.

Die Zellen wuchsen ohne erkennbare lag-Phase linear bis zum Erreichen einer stationären Phase (Abb.5). Im Vergleich zu Wachstumskinetiken in glyphosاتفreiem Medium (Abb.4A) ist das Wachstum drastisch verlangsamt und das Frischgewicht nach Erreichen der stationären Phase deutlich reduziert.

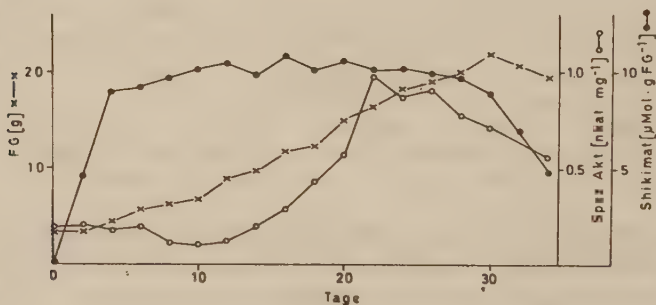


Abb.5 Wachstum der nicht adaptierten *C.sempervirens* Kultur nach Transfer in Medium mit 0,5mM Glyphosat (x—x). Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase (o—o) und des Shikimisäuregehaltes der Zellen (●—●)

Sofort nach dem Transfer in glyphosathaltiges Medium begannen die Zellen Shikimisäure zu akkumulieren. Die Menge der Shikimisäure erreichte schon nach zwei Tagen einen Maximalwert, der bis zum Ende der Wachstumsphase konstant blieb und danach deutlich abnahm.

Diese Abnahme ist offensichtlich auf eine fortschreitende Zerstörung von Zellen zurückzuführen, denn die lebenden Zellen geben keine Shikimisäure ins Medium ab. S3P konnte in keinem Fall, weder intra- noch extrazellulär, nachgewiesen werden.

Die Akkumulation von Shikimisäure unter Glyphosateinfluß ist durch eine Reihe von Untersuchungen gut dokumentiert (Amrhein et al., 1980 und 1983; Berlin und Witte, 1981).

Shikimisäure, nicht aber S3P, akkumuliert auch bei Fagopyrum esculentum Zellkulturen. Für diesen Fall wurde beispielhaft gezeigt, daß S3P dephosphoryliert und das entstehende Shikimat in der Vakuole gespeichert wird (Holländer-Czytko und Amrhein, 1983).

Die spezifische Aktivität der EPSP Synthase blieb zunächst etwa konstant und stieg dann langsam bis zu einem Maximum an, das am Ende der Wachstumsphase erreicht wurde (Abb.5).

Während dieses Versuches erhöhte sich die spezifische Aktivität der EPSP Synthase der Kultur um einen Faktor 4,5 und der Shikimisäuregehalt stieg auf das 45-fache.

In dieser Weise an 0,5 mM Glyphosat adaptierte C. sempervirens Zellkulturen zeigten nach circa einjähriger Subkultivierung in Medium mit 0,5 mM Glyphosat eine 15-fach erhöhte spezifische Aktivität der EPSP Synthase und 45-fache Akkumulation von Shikimisäure (Amrhein et al., 1983).

Die Akkumulation von Shikimisäure ist eine sehr schnelle Reaktion der Zellkultur auf Glyphosatzugabe, die Steigerung der EPSP Synthase ist demgegenüber langsam, aber schon durch nur einmaligen Transfer in glyphosathaltiges Medium deutlich feststellbar.

Zusätzlich wurden Färbungen mit Phenosafranin durchgeführt wodurch tote Zellen rot gefärbt werden, lebende dagegen bleiben ungefärbt, da sie den aufgenommenen Farbstoff aktiv austransportieren (Widholm, 1972).

Eine genaue quantitative Auswertung war nicht möglich, denn die Zellen lagen im Allgemeinen als Aggregate von Dutzenden und mehr Zellen vor und ließen sich nicht voneinander separieren. Eine grobe Schätzung ergab aber eine konstante Zahl von circa 60-80% lebender Zellen während der gesamten Wachstumsphase. Diese Zahl sank aber ab dem 30.Tag bis zum 32.Tag deutlich auf etwa 20-30%

ab.

Dieses Zellsterben war offenbar die Ursache für die Abnahme des intrazellulären Gehaltes an Shikimisäure. Eine Analyse des Mediums ergab, daß geringe Mengen von Shikimisäure nachweisbar waren. Die Färbungen zeigten eindeutig, daß die meisten Zellen, nicht aber nur wenige mutativ veränderte, die Einwirkung der subletalen Glyphosatkonzentration überlebten. Dies stand im Einklang mit dem beobachteten Wachstumsverlauf, nämlich dem Fehlen einer lag-Phase und dem langsamen, linearen Wachstum. Bei Überleben und Proliferation von nur wenigen mutierten Zellen würde man eine lange lag-Phase und ein eventuell verlangsamtes exponentielles Wachstum erwarten.

Dennoch sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren, da bei großen Zellaggregationen durch Abschirmung äußerer, toter Zellen im Inneren Bereiche niedriger Glyphosatkonzentration entstehen könnten, wodurch auch sensitiven Zellen das Wachstum ermöglicht werden könnte.

1.3. Stabilität der erhöhten EPSP Synthase Aktivität glyphosat-adaptierter Kulturen

Beim routinemäßigen Transfer der adaptierten Zellen in frisches glyphosathaltiges Medium blieb die gesteigerte EPSP Synthase Aktivität erhalten. Die spezifische Aktivität von Rohextrakten aus der späten logarithmischen Phase adaptierter Kulturen ergaben Werte von 7,2 bis 12,8 nkat/mg Protein. Gegenüber nicht adaptierten Kulturen mit spezifischen Aktivitäten von 0,23 bis 0,52 nkat/mg Protein war ungefähr eine Steigerung auf das 30-40 fache gegeben.

Beim Transfer von adaptierten Zellen in glyphosatfreies Medium ergab sich eine langsame, aber kontinuierliche Abnahme der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase (Abb. 6).

Dabei sank diese nach 20 Transfers (ca. 60 Generationen) auf 50% des Ausgangswertes ab. Danach fiel die spezifische Aktivität langsam weiter, ohne aber innerhalb des Versuchszeitraumes von mehr als 7 Monaten auf den Wert der nicht adaptierten Kultur abzufallen.

Dieser Verlauf deutet daraufhin, daß vielleicht zwei Faktoren die Erhöhung der EPSP Synthase Aktivität bewirken: ein instabiler Mechanismus, der die Anwesenheit von Glyphosat im Medium erfordert und ein stabiler, genetisch fixierter, der auch ohne diese Bedingung wirksam ist.

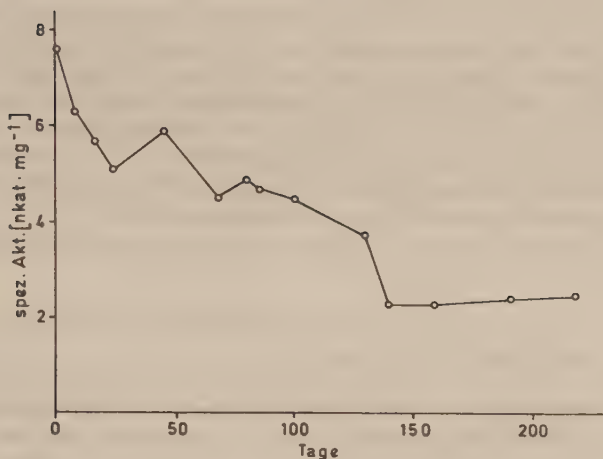


Abb.6 Abnahme der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase glyphosatadaptierter *C.sempervirens* Zellen nach Transfer und weiterer Kultivierung in Medium ohne Glyphosat

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die erhöhte Aktivität der EPSP Synthase der adaptierten Kulturen auf einer mutativen Veränderung oder auf einer Überproduktion des Enzyms beruht.

2. Reinigung der EPSP Synthase

Eine Reinigung der EPSP Synthase aus den glyphosatadaptierten und nicht adaptierten *C. sempervirens* Zellkulturen wurde durchgeführt, um eine vergleichende Charakterisierung der beiden Enzyme zu ermöglichen, polyklonale Antiseren zu erzeugen und die durchgeführten genetischen Analysen zu ermöglichen.

Zwei verschiedene Reinigungsmethoden wurden angewendet, die im Material- und Methodenteil näher beschrieben sind: die konventionelle und die affinitätschromatographische Reinigung.

2.1. Die konventionelle Reinigung.

Tabelle 1 zeigt das Protokoll einer konventionellen Reinigung der EPSP Synthase aus adaptierten Kulturen, basierend auf der Reinigungsvorschrift von Leifeld 1982.

	Ges. Akt. (μ kat)	Protein (mg)	spez. Akt. (nkat/mg Protein)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Rohextrakt	12,55	1706	7.2	100	-
(NH_4) ₂ SO ₄ - fällung	10,50	667	15.7	86	2,2
Sephacryl S 200	7,33	127	57,7	60	8,0
Sephadex G-25	6,46	119	54,3	53	7,5
DEAE-Cellu- lose	3,02	6,8	445	25	61,8

Tab.1 Konventionelle Reinigung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten Kulturen.

Bei einer Ausbeute von 25% wurden 6,8 mg gereinigter EPSP Synthase mit einer spezifischen Aktivität von 445 nkat/mg Protein erhalten.

Der wesentliche Nachteil dieser Methode war der relativ große Zeit- und Materialaufwand. Außerdem zeigte eine gelchromatographische Überprüfung der Reinheit (SDS Gel) leichte Verunreinigungen der Präparation mit Fremdproteinen. Zudem war die EPSP Synthase Aktivität nach der Reinigung nicht stabil, sondern fiel schon nach circa 48 Stunden (Lagerung bei +4°C) auf 50% der Anfangsaktivität ab.

2.2. Die affinitätschromatographische Reinigung

Diese Methode zur Reinigung der EPSP Synthase in einem einzigen Reinigungsschritt wurde von Steinrücken und Schulz entwickelt und basiert auf der Bindung der EPSP Synthase an Phosphocellulose (Steinrücken et al., 1986).

Diese Bindung beruht auf der Affinität des Enzyms zu den Phosphatgruppen des Materials und wird nicht durch unspezifische Ladungseffekte hervorgerufen. Die in allen Rohextrakten vorhandenen Phosphatasen stellten allerdings ein großes Problem dar, da sie die Phosphocellulose umsetzen und so eine Reinigung aus einem Rohextrakt unmöglich machten. Die Phosphocellulose konnte deshalb bei früheren Reinigungen nur nach sorgfältiger Abtrennung der Phosphatasen durch mehrere Reinigungsschritte angewendet werden. Die Elution der EPSP Synthase erfolgte dann selektiv durch Zugabe der Substrate S3P und PEP, oder Glyphosat (Lewendon und Coggins, 1983; Mousdale und Coggins, 1984).

Die Ein-Schritt-Reinigung der EPSP Synthase aus einem Rohextrakt wird durch die Zugabe mikromolarer Mengen von Wolframat ermöglicht. Dieses hemmt die Phosphatasen und verhindert deren Bindung an die Phosphocellulose, ohne die EPSP Synthase zu beeinflussen (Schulz, 1986).

Wie in anderen früher beschriebenen Fällen konnte auch bei der Affinitätschromatographie der C. sempervirens EPSP Synthase an Phosphocellulose keine Elution des Enzyms durch S3P, PEP oder Glyphosat allein festgestellt werden (Lewendon und Coggins, 1983; Schulz, 1986).

Die Elution wurde mit 0,1 mM S3P und 0,1 mM Glyphosat durchgeführt, vor allem um Probleme mit dem entstehenden Reaktionsprodukt Phosphat bei S3P/PEP-Elution zu vermeiden.

Tabelle 2 zeigt das Protokoll einer affinitätschromatographischen Reinigung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten Kulturen.

	Ges.Akt. (μ kat)	Protein (mg)	spez.Akt. (nkat/mg Protein)	Ausbeute (%)	Anreiche- rung (-fach)
Rohextrakt	13,32	1287	10,4	100	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ - fällung	11,73	601	19,4	88	1,9
Sephadex G-25	9,09	543	16,7	68	1,6
Phospho- cellulose	7,88	13,5	584	59	56,2

Tab.2 Affinitätschromatographische Reinigung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten Kulturen.

In diesem Fall konnten 13,5 mg EPSP Synthase bei 59% Ausbeute und einer spezifischen Aktivität von 584 nkat/mg Protein gereinigt werden.

Das so gereinigte Enzym war gelchromatographisch homogen (Abb.7) und die Aktivität war mindestens 6 Monate stabil, wenn es bei -20°C gelagert wurde.

Abb.8 zeigt das Elutionsprofil der Phosphocellulosesäule aus diesem Versuch. Besonders deutlich wird hier, wie auch aus Abb.7 zu ersehen ist, die außerordentliche Effizienz dieser Methode, die in einem einzigen Reinigungsschritt alle Fremdproteine entfernt, ohne einen nennenswerten Verlust an EPSP Synthase zu verursachen.

Der zusätzlich geringe Zeitaufwand von zwei Tagen und die gute Reproduzierbarkeit machten dieses Reinigungsverfahren besonders praktikabel, und es wurde daher routinemäßig durchgeführt.

Die affinitätschromatographische Reinigung der EPSP Synthase aus nicht adaptierten Kulturen war etwas aufwendiger, da diese das Enzym nicht überproduzierten und der Anteil der EPSP Synthase am Gesamtprotein kleiner war als bei den adaptierten Kulturen.

Tabelle 3 zeigt eine affinitätschromatographische Reinigung der EPSP Synthase aus nicht adaptierten Kulturen.

	Ges.Akt. (μ kat.)	Protein (mg)	spez.Akt. (nkat./mg Protein)	Ausbeute (%)	Anreiche- rung (-fach)
Rohextrakt	0,515	1420	0,363	100	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ - fällung	0,476	725	0,657	92	1,8
Sephadex G-25	0,431	682	0,587	84	1,6
DEAE-Cellu- lose	0,287	44,9	4,99	56	13,7
Sephadex G-25	0,232	49,9	4,65	45	12,8
Phospho- cellulose	0,196	0,38	516	38	1420

Tab.3 Affinitätschromatographische Reinigung der EPSP Synthase aus nicht adaptierten Kulturen.

In diesem Versuch wurden 0,38 mg gereinigtes Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 516 nkat/mg Protein isoliert. Die Ausbeute betrug 38%. Die gereinigte EPSP Synthase erwies sich als gelchromatographisch homogene Präparation (Abb.7).

Bei der Reinigung aus nicht adaptierten Kulturen war es notwendig, vor der Phosphocellulosesäule eine DEAE-Cellulosechromatographie durchzuführen. Bei Auslassung dieses Schrittes und direkter Affinitätschromatographie wurde die Ausbeute deutlich erniedrigt, da zuviel EPSP Synthase beim Waschen der Säule im Durchlauf verloren ging. Ursache dafür könnte eine in diesen Kulturen relativ hohe Phosphataseaktivität sein; dieser Effekt wurde aber

nicht näher untersucht.

Die Reinigung der EPSP Synthase aus nicht adaptierten Kulturen mit der konventionellen Methode war aufgrund der niedrigen Aktivitäten schwierig und nur sehr schlecht reproduzierbar.

Ein Vergleich der beiden verschiedenen Reinigungsmethoden für die adaptierte Kultur (Tab.1 und Tab.2) zeigt die Tauglichkeit der affinitätschromatographischen Methode für die Reinigung der EPSP Synthase aus diesen Kulturen.

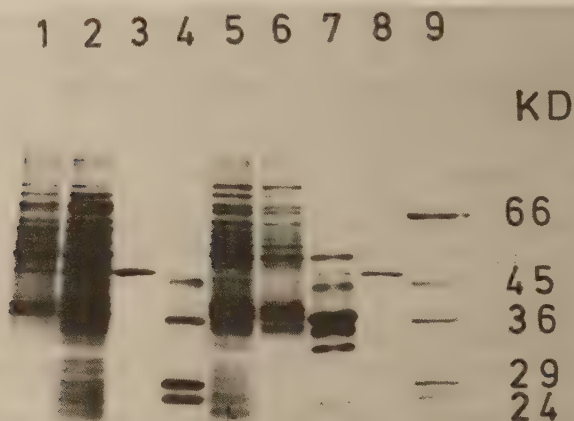


Abb.7 SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) der EPSP Synthase Reinigung aus adaptierten (Spur 1-3) und aus nicht adaptierten (Spur 5-8) C.sempervirens Kulturen.

Spur 1	Rohextrakt	50µg
Spur 2	Sephadex G-25	50µg
Spur 3	Phosphocellulose	7,5µg
Spur 4 + 9	Molekulargewichtsmarker	
Spur 5	Rohextrakt	50µg
Spur 6	Sephadex G-25	50µg
Spur 7	DEAE-Cellulose	25µg
Spur 8	Phosphocellulose	5µg

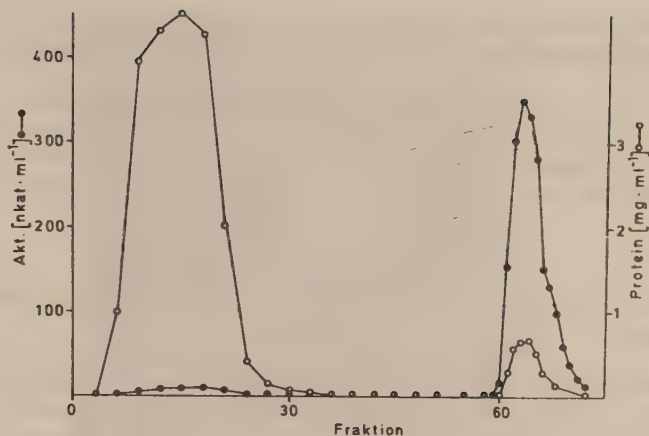


Abb.8 Reinigung der EPSP Synthase glyphosatadaptierter *C.sempervirens* Zellen an Phosphocellulose.
 Aufgetragene Proteinmenge: 550 µg.
 Die Elution erfolgte mit 0,1mM S3P und 0,1mM Glyphosat in Puffer C.

Die spezifischen Aktivitäten der gereinigten EPSP Synthasen aus adaptierten und nichtadaptierten Kulturen sind annähernd gleich groß.Unter der noch zu beweisenden Annahme, daß beide Enzyme identisch sind und die adaptierte Kultur mehr Kopien des identischen Enzyms besitzt, kann man den Anteil der EPSP Synthase am Gesamtprotein berechnen. Nimmt man die gereinigte EPSP Synthase als 100% rein an und berücksichtigt man die jeweilige Ausbeute, berechnet als Prozent der Ausgangsaktivität, so ergeben sich folgende Anteile der EPSP Synthase am Gesamtprotein des Rohextraktes:

bei der nicht adaptierten Kultur	0,07%
bei der adaptierten Kultur	1,78%.

Dies entspräche einer 25-fachen Überproduktion der EPSP Synthase in glyphosatadaptierten Kulturen.

3. Vergleichende Charakterisierung der EPSP Synthasen aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen

Durch vergleichende Untersuchungen der gereinigten EPSP Synthasen aus beiden Kulturen sollte festgestellt werden, ob die gesteigerte EPSP Synthase Aktivität der adaptierten Zellkulturen auf einer mutativen Veränderung des Enzyms oder auf einer Enzymakkumulation beruhte.

3.1. Molekulargewichtsbestimmung unter denaturierenden Bedingungen

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese der gereinigten EPSP Synthasen aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen ergab jeweils nur eine Bande mit einem übereinstimmendem Molekulargewicht.

Die Bestimmung der Molekulargewichte aus jeweils sechs voneinander unabhängigen Enzympräparationen ergab für die EPSP Synthase aus beiden Kulturen ein Molekulargewicht von 45000 D $\pm$ 1500 D.

3.2. Gelelektrophorese und Molekulargewichtsbestimmung unter nicht denaturierenden Bedingungen

Bei Gelelektrophorese der gereinigten Enzyme unter nicht denaturierenden Bedingungen und anschließender Färbung mit dem Aktivitätstest nach Nimmo und Nimmo (1982), konnte für beide Kulturen nur eine Bande festgestellt werden. Die EPSP Synthasen zeigten keine Unterschiede in ihrem Laufverhalten (Abb. 9).

Bei diesem Test wird die im Gel immobilisierte EPSP Synthase mit den Substraten PEP und S3P inkubiert, und das bei der Reaktion freigesetzte Phosphat bildet mit dem vorhandenen Kalzium sofort am Ort seiner Entstehung unlösliches, weißes Kalziumphosphat. So ist die Lage der aktiven EPSP Synthase im Gel eindeutig feststellbar.

Bei Abwesenheit eines der Substrate der Reaktion oder in Anwesenheit von 10 mM Glyphosat konnte keine Bande festgestellt werden (Abb. 9).

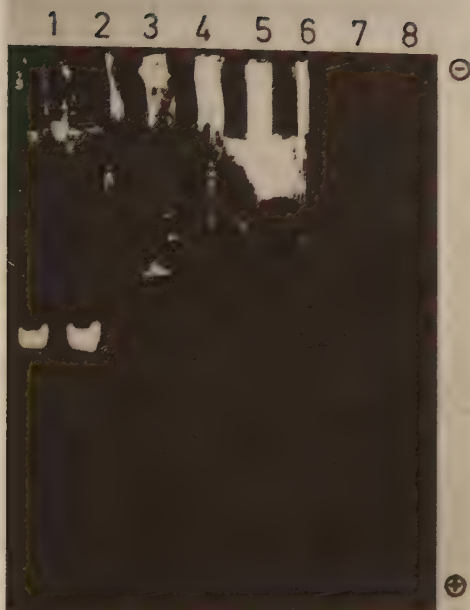


Abb.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der gereinigten EPSP Synthasen aus beiden Kulturen unter nicht denaturierenden Bedingungen und Nachweis der Enzymaktivität nach der Methode von (Nimmo und Nimmo (1982).

Spur 1, 3, 5 und 7: gereinigte EPSP Synthase der adaptierten Kultur

Spur 2, 4, 6 und 8: gereinigte EPSP Synthase der nicht adaptierten Kultur

Spur 3 und 4: mit 10mM Glyphosat

Spur 5 und 6: ohne S3P

Spur 7 und 8: ohne PEP

Die Bestimmung des Molekulargewichts der nativen EPSP Synthase wurde durch Gelfiltration mit Sephaeryl S-200 durchgeführt. Gereinigte EPSP Synthase wurde mit den Eichproteinen gemischt auf die Säule gebracht und anhand ihrer Aktivität identifiziert. Die Eichproteine wurden durch Proteinbestimmung ermittelt.

Für das gereinigte Enzym aus beiden Kulturen ergab sich ein identisches Molekulargewicht des nativen Enzyms von ca. 44700 D (Abb.10A und Abb.10B).

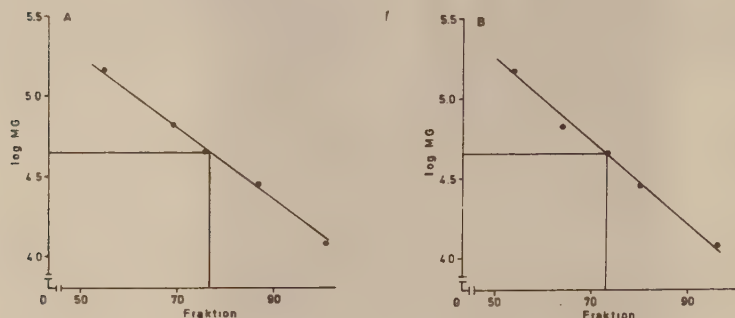


Abb.10 Bestimmung des Molekulargewichts der EPSP Synthase aus adaptierten (A) und nicht adaptierten Kulturen (B) unter nicht denaturierenden Bedingungen durch Gelfiltration an Sephacryl S-200. Molekulargewichtsmarker, siehe Material und Methoden.

Aus der Übereinstimmung der Molekulargewichtsbestimmungen unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen kann geschlossen werden, daß die EPSP Synthase in beiden C.sempervirens Zellkulturen ein monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von ca.45500 D ist. .

3.3.Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Chromatofokussierung

Bei der Chromatofokussierung wird innerhalb der Säule durch die Eigenschaften von Säulenmaterial und Elutionspuffer ein linearer pH-Gradient erzeugt. Aufgetragenes Protein eluiert innerhalb dieses Gradienten bei demjenigen pH-Wert, der seinem isoeletrischen Punkt (IEP) entspricht, da die Gesamtnettoladung des Proteins am IEP gleich Null ist.

Der auf diese Art ermittelte IEP der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen, war in beiden Fällen identisch und wurde mit 5,4 bestimmt (Abb.11A und 11B).

Ein vergleichbarer Versuch wurde nur mit der EPSP Synthase aus Aerobacter aerogenes durchgeführt und ergab einen IEP von 4,6 (Steinrücken, 1982).

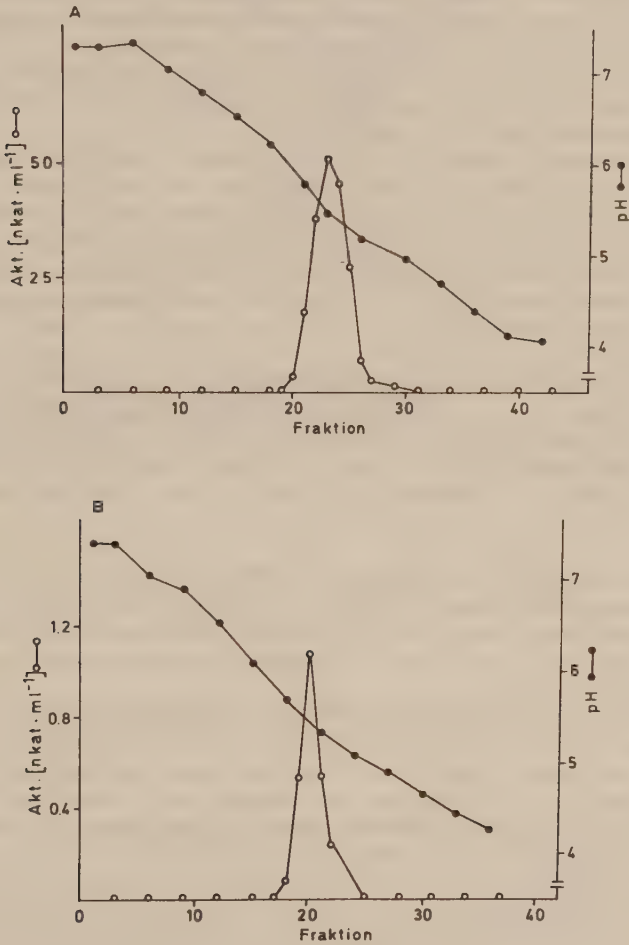


Abb.11 Bestimmung des isoelektrischen Punktes der EPSP Synthase aus der adaptierten (A) und der nicht adaptierten Kultur (B) durch Chromatofokussierung an Polybuffer Exchanger 94 mit Polybuffer 74.

3.4. Kinetische Untersuchungen der EPSP Synthasen aus beiden Kulturen

Neben den bisher beschriebenen vergleichenden Strukturuntersuchungen sollte durch kinetische Messungen die Affinität der EPSP Synthase zu ihren Substraten und ihre Hemmung durch Glyphosat qualitativ und quantitativ beschrieben werden.

Sollte eine veränderte EPSP Synthase Ursache des Wachstums der adaptierten Kultur in glyphosathaltigem Medium sein, dann muß diese glyphosatsensitiv sein.

Diese Eigenschaft wäre mit einer deutlichen Steigerung der Inhibitorkonstanten bezüglich PEP verbunden, das heißt, mit einer Abnahme der Affinität des Enzyms für Glyphosat, das mit PEP um die gleiche Bindungsstelle am Enzym kompetiert. Dies und auch eine Abnahme der Affinität des Enzyms für beide Substrate konnte bei der glyphosatsensitiven EPSP Synthase aus Aerobacter aerogenes gezeigt werden (Sost et al., 1984; Schulz et al., 1984).

Alle hier beschriebenen kinetischen Versuche wurden mit Hilfe eines gekoppelten optischen Tests durchgeführt (Boocock und Cogins, 1983). Die Vorteile dieses Testsystems gegenüber dem sonst verwendeten Phosphattest sind die größere Empfindlichkeit und die Möglichkeit, die Reaktion in der Küvette kinetisch zu verfolgen.

Die gereinigte EPSP Synthase aus nicht adaptierten Kulturen hatte einen apparenten K_m Wert für S3P von $23,5 \mu M$, bei einer konstanten Konzentration von 1 mM PEP. Wurden beide Substrate in sättigender Konzentration (1 mM) eingesetzt, betrug v_{max} $42,6 \text{ pMol/sec.}$ (Abb.12).

Die Hemmung der Reaktion durch Glyphosat erwies sich als unkompetitiv bezüglich S3P. Das heißt, bei steigenden Inhibitorkonzentrationen verringern sich sowohl v_{max} der Reaktion als auch der K_m Wert des Enzyms bezüglich S3P. Daraus resultieren im Lineweaver-Burk Diagramm annähernd parallele Geraden bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (Abb.12).

Zur Quantifizierung der Inhibitorkonstanten wurde ein Sekundär-diagramm erstellt. Dazu wurden die y-Achsenabschnitte aus dem Lineweaver-Burk Diagramm gegen die entsprechenden Glyphosatkonzentrationen aufgetragen. Die entstandenen Punkte definieren eine Gerade und der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse entspricht der Inhibitorkonstanten.

Der so ermittelte K_{ii} Wert von Glyphosat bezüglich S3P betrug $11,1 \mu M$ (Abb.13).

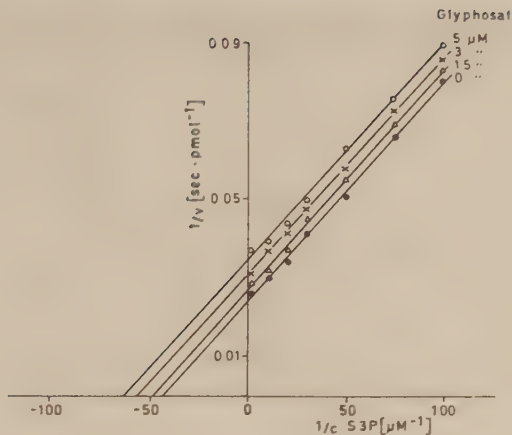


Abb.12 Lineweaver-Burk Diagramm der Hemmung der EPSP Synthese aus nicht adaptierten *C.sempervirens* Zellen durch Glyphosat (mit S3P als variablem Substrat). Die Konzentration von PEP war 1mM.

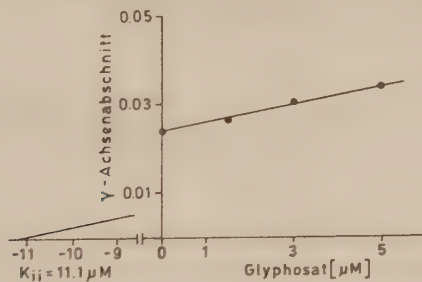


Abb.13. Bestimmung des K_{i1} -Wertes der EPSP Synthese der nicht adaptierten *C.sempervirens* Kultur bezüglich S3P.

Abb.14 zeigt die gleichen Versuche mit der gereinigten EPSP Synthese aus glyphosatadaptierten Kulturen.

Der K_m Wert bezüglich S3P beträgt $18,0 \mu\text{M}$ und v_{max} , bei Substratkonzentrationen von 1 mM bestimmt, war $40,8 \text{ pMol/sec.}$

Die Hemmung durch Glyphosat erwies sich als unkompetitiv bezüglich S3P und der K_{ii} Wert betrug hier $6,7 \mu\text{M}$ (Abb.15).

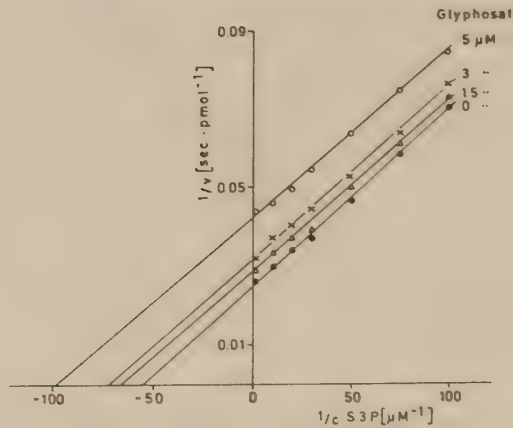


Abb.14 Lineweaver-Burk Diagramm der Hemmung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten *C.sempervirens* Zellen durch Glyphosat (mit S3P als variablem Substrat). Die PEP Konzentration war 1mM.

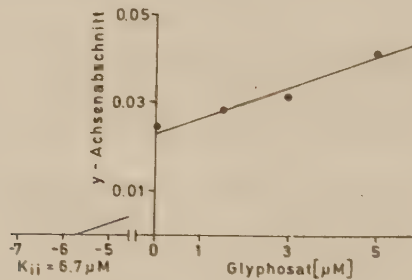


Abb.15 Bestimmung des K_{ii} -Wertes der EPSP Synthase der adaptierten *C.sempervirens* Kultur bezüglich S3P.

Die folgenden Bestimmungen der Enzymkonstanten bezüglich PEP wurden analog durchgeführt, wobei die S3P Konzentration immer 1 mM betrug.

Das gereinigte Enzym aus nicht adaptierten Kulturen hatte einen K_m Wert von $73,7 \mu\text{M}$ für PEP und in diesem Versuch wurde ein

v_{max} von 41,7 pMol/sec. bestimmt (Abb.16).

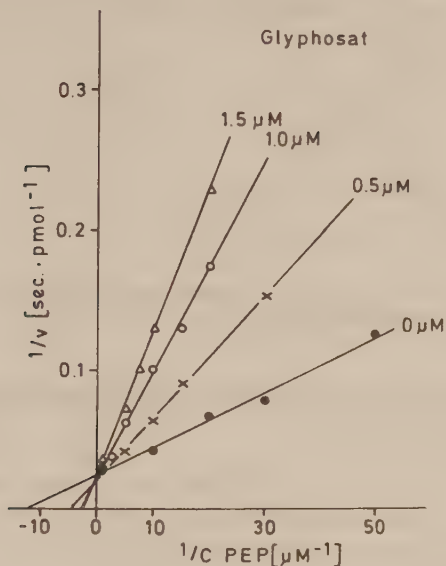


Abb.16 Lineweaver-Burk Diagramm der Hemmung der EPSP Synthase aus nicht adaptierten *C.sempervirens* Zellen durch Glyphosat (mit PEP als variablem Substrat). Die Konzentration von S3P war 1mM.

Die Glyphosathemmung ist bezüglich PEP kompetitiv. Das heißt bei steigender Inhibitorkonzentration bleibt v_{max} konstant, während der apparente K_m Wert größer wird.

Die quantitative Bestimmung wurde durch ein Sekundärdiagramm ermöglicht, wobei die Steigung der Geraden aus dem Lineweaver-Burk Diagramm gegen die entsprechenden Glyphosatkonzentrationen aufgetragen wurde. Der Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der x-Achse entspricht der Inhibitorkonstanten.

Der so ermittelte K_i Wert bezüglich PEP betrug 0,32 μM (Abb.17).

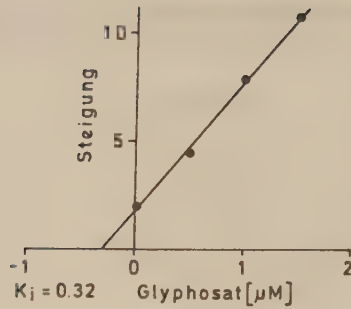


Abb.17 Bestimmung des K_i -Wertes der EPSP Synthase der nicht adaptierten *C.sempervirens* Kultur bezüglich PEP.

Abb.18 zeigt für die gereinigte EPSP Synthase aus adaptierten Kulturen ein ganz ähnliches Bild.

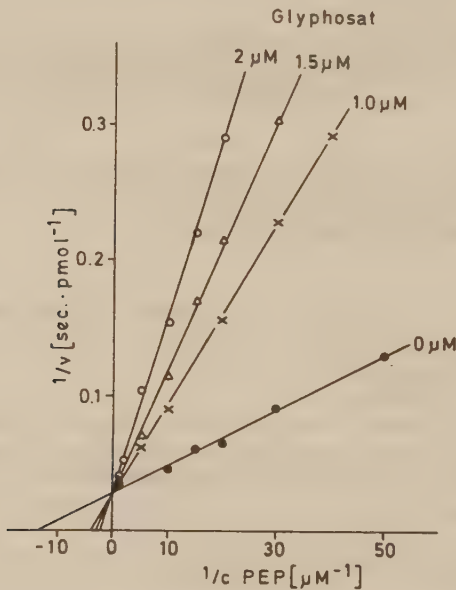


Abb.18 Lineweaver-Burk Diagramm der Hemmung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten *C.sempervirens* Zellen durch Glyphosat (mit PEP als variablem Substrat). Die Konzentration von S3P war 1mM.

Der K_m Wert bezüglich PEP betrug $85,9 \mu\text{M}$ und v_{max} $37,0 \text{ pMol/sec.}$. Die Hemmung war bezüglich PEP auch hier kompetitiv und der ermittelte K_i Wert betrug ebenfalls $0,32 \mu\text{M}$ (Abb.19).

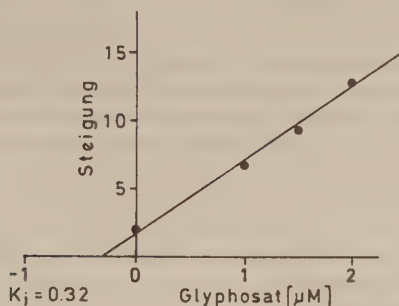


Abb.19 Bestimmung des K_i -Wertes der EPSP Synthase der adaptierten C.sempervirens Kultur bezüglich PEP.

Tabelle 4 gibt die ermittelten kinetischen Parameter für die gereinigten EPSP Synthasen aus beiden Kulturen wieder. Die Werte für die Umsatzraten wurden jeweils aus beiden Messungen gemittelt und gerundet.

	EPSP Synthase aus <u>C.sempervirens</u>	
	nicht adaptierte Kultur	adaptierte Kultur
K_m bezüglich S3P	$23,5 \mu\text{M}$	$18,0 \mu\text{M}$
K_m bezüglich PEP	$73,7 \mu\text{M}$	$85,9 \mu\text{M}$
Umsatzrate (Mol/min $\times$ Mol Enzym)	2500	2300
K_{i1} bezüglich S3P	$11,1 \mu\text{M}$	$6,7 \mu\text{M}$
K_i bezüglich S3P	$0,32 \mu\text{M}$	$0,32 \mu\text{M}$

Tab.4. Vergleich der kinetischen Konstanten der EPSP Synthasen aus aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen.

Die beiden EPSP Synthase Präparationen zeigen keine signifikanten Unterschiede bei Berücksichtigung aller untersuchten kinetischen Parameter. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Identität dieses Enzyms in beiden Kulturen.

Vor allem die Übereinstimmung der K_i Werte bezüglich PEP schließt das Vorhandensein einer glyphosatinsensitiven EPSP Synthase in adaptierten Kulturen eindeutig aus. Dieses Resultat war in Übereinstimmung mit der schon früher gemachten Feststellung identischer I_{50} Werte der Glyphosathemmung für beide Kulturen (Leifeld, 1982; Johanning, 1983).

Der Quotient K_i/K_m kann als Maß der Affinität des Glyphosats zur EPSP Synthase, bezogen auf die jeweilige Substratbindestelle angesehen werden. Dieser Quotient beträgt bei nicht adaptierten bzw. adaptierten Kulturen bezogen auf S3P 0,47 bzw. 0,37 und bezogen auf PEP 0,004 bzw. 0,004.

Die hohen Werte für S3P zeigen, daß die Affinität der EPSP Synthase für Glyphosat kaum größer ist als für S3P. Andererseits hat das Enzym eine viel größere Affinität zu Glyphosat als zu PEP. Eine insensitive EPSP Synthase müßte einen Quotienten von größer 1 besitzen, wie das für die insensitive EPSP Synthase aus Aerobacter aerogenes gezeigt wurde (Schulz, 1986).

Die hier gefundenen K_m und K_i Werte stimmen in der Größenordnung mit denjenigen überein, die für EPSP Synthasen aus intakten Pflanzen (Mousdale und Coggins, 1984) oder anderen Zellkulturen (Steinrücken et al., 1986; Holländer-Czytko, 1986). Dabei ist vor allem auch zu bedenken, daß teilweise unter anderen Bedingungen gemessen wurde, etwa unterschiedlichen Substratkonzentrationen des nicht variierten Substrats, oder anderen pH Werten. Der Einfluß des pH Wertes auf die Hemmung der EPSP Synthase durch Glyphosat wurde eindeutig gezeigt (Steinrücken und Amrhein, 1984b; Rubin et al., 1984).

Kompetitive Hemmung durch Glyphosat bezüglich PEP ist auch in allen anderen untersuchten und beschriebenen Fällen für die EPSP Synthase gefunden worden.

Unkompetitive Hemmung bezüglich S3P fand man bei E.coli (Lewendon und Coggins, 1983), bei N.crassa (Boocock und Coggins, 1983), bei Nicotiana sylvestris (Rubin et al., 1984) und bei Pseudomonas aeruginosa (Erdmann, 1986).

3.5 Immunologische Versuche

Als weiterer Ansatzpunkt zur Klärung der Frage, ob die EPSP Synthasen aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten C.sem-

pervirens Zellkulturen identisch sind, wurden eine Reihe von immunologischen Versuchen durchgeführt.

Polyklonale Antiseren gegen die gereinigte EPSP Synthase aus C.sempervirens wurden in Kaninchen erzeugt. Dabei wurden sowohl nach konventioneller, als auch nach affinitätschromatographischer Vorschrift gereinigte Enzympräparationen verwendet. Die erzeugten Antiseren zeigten keine qualitativen Unterschiede in ihrer Reaktion mit der EPSP Synthase. Im Folgenden sind nur Versuche mit dem aktivsten Antiserum dargestellt, das durch Immunisierung mit affinitätsgereinigter EPSP Synthase erhalten wurde.

3.5.1. Doppelimmuno-Diffusionstest

Der Doppelimmuno-Diffusionstest (Ouchterlony, 1949) zeigt eine Verschmelzung der Präzipitationslinien, was auf eine Übereinstimmung der antigenen Determinanten der EPSP Synthasen gegenüber diesem Serum schließen läßt (Abb.20). Auch bei Versuchen mit vier anderen, in verschiedenen Kaninchen hergestellten Antiseren gegen die gereinigte EPSP Synthase wurde diese vollständige Fusion der Präzipitationslinien festgestellt.



Abb.20 Doppelimmuno-Diffusionstest (nach Ouchterlony) der EPSP Synthasen aus adaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Kulturen. Das Zentraldepot enthielt 30 μ l Antiserum gegen die EPSP Synthase aus C.sempervirens. Die Depots a, c und e enthalten 1, 3 und 6 μ g gereinigte EPSP Synthase aus adaptierten Zellen. Die Depots b, d und f enthalten 125, 250 und 375 μ g Rohextrakt aus nicht adaptierten Kulturen.

Polyklonale Antiseren gegen die gereinigten EPSP Synthasen aus Aerobacter aerogenes und E.coli, die von A.Schulz zur Verfügung gestellt wurden, zeigten keine Reaktion mit der EPSP Synthase von C.sempervirens.

3.5.2. Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und Western-Blot

Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und anschließende Immunodetektion der EPSP Synthase ist ein besonders empfindliches Verfahren zur Feststellung und Charakterisierung der Antigen-Antikörper Reaktionen. Hier diente es zur Klärung mehrerer Fragen:

1. Waren die Antikörper spezifisch, daß heißt reagierten sie nur mit der EPSP Synthase oder auch mit anderen Proteinen eines Rohextraktes der C.sempervirens Kulturen?
2. Reagierten gereinigte EPSP Synthasen aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen qualitativ und quantitativ identisch mit den Antikörpern?
3. Unterschieden sich die Rohextrakte aus beiden Kulturen hinsichtlich ihrer quantitativen Reaktion mit den Antikörpern?

Abb.21 beweist, daß die Antiseren mit Rohextrakten aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen (Spur 5 und 6) nur mit einer Proteinbande reagierten, also spezifisch waren.

Die Reaktion auf gleiche Mengen gereinigter EPSP Synthase aus beiden Kulturen war qualitativ und quantitativ gleich (Spur 7 und Spur 8).

Die Position der immunologisch nachgewiesenen EPSP Synthase Banden im Gel waren in allen Fällen identisch (Spur 5-8) und stimmten mit der des gereinigten und angefärbten Enzyms überein (Spur 3 und 4).

Wurden etwa gleiche Proteinmengen aus Rohextrakten aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen aufgetragen, dann zeigte der Rohextrakt der adaptierten Kultur eine viel deutlichere immunologische Reaktion (Spur 5 und 6).

Diese immunologischen Befunde waren ein weiterer, deutlicher Hinweis auf die Identität der EPSP Synthasen beider Kulturen und die Überakkumulation dieses Enzyms in der adaptierten Zellkultur.

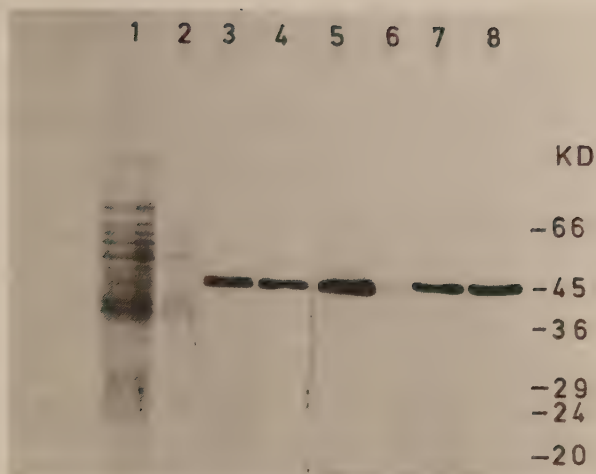


Abb.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) von Rohextrakten und gereinigten EPSP Synthasen adaptierter und nicht adaptierter *C.sempervirens* Kulturen.
 Spur 1-4 Proteinfärbung mit Serva Blau R.
 Spur 5-8 Immunodetektion der EPSP Synthase mit dem polyclonalen Antiserum nach Western-Blot.

Spur 1 und 5	Rohextrakt (50µg) der adaptierten Kultur
Spur 2 und 6	Rohextrakt (30µg) der nicht adaptierten Kultur
Spur 3 und 7	gereinigte EPSP Synthase der adaptierten Kultur (Spur 3: 15µg; Spur 7: 1µg)
Spur 4 und 8	gereinigte EPSP Synthase der nicht adaptierten Kultur (Spur 4: 15µg; Spur 8: 1µg)

3.5.3. Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen und Western-Blot

Die Reaktion der EPSP Synthasen im Rohextrakt und in gereinigter Form aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen wurde auch unter nicht denaturierenden Bedingungen untersucht.

Abb.22 zeigt die Reaktion des Antiserums mit gereinigter EPSP Synthase aus adaptierten (Spur 2) und nicht adaptierten Kulturen (Spur 4). In Spur 1 und 3 entsprechend für die Rohextrakte aus beiden Kulturen.



Abb.22 Gelelektrophorese von Rohextrakten und gereinigten EPSP Synthasen adaptierter und nicht adaptierter *C.sempervirens* Kulturen unter nicht denaturierenden Bedingungen, und anschließender Immunodetektion mit polyklonalem Antiserum.
 Spur 1: Rohextrakt der adaptierten Kultur (5µg)
 Spur 2: gereinigte EPSP Synthase der adaptierten Kultur (2µg)
 Spur 3: Rohextrakt der nicht adaptierten Kultur (150µg)
 Spur 4: gereinigte EPSP Synthase der nicht adaptierten Kultur (2µg)

Auch unter diesen nicht denaturierenden Bedingungen stimmte die Lage der jeweils einzigen reaktiven Bande in jeder Spur mit der in allen anderen überein.

Es wurden gleiche Mengen gereinigter EPSP Synthase aus beiden Kulturen aufgetragen und ungefähr gleich starke Reaktionen mit dem Antiserum erzielt (Spur 2 und 4).

Vom Rohextrakt der nicht adaptierten Kultur (Spur 3) wurde aber etwa 30 mal mehr Protein aufgegeben als vom Rohextrakt der adaptierten (Spur 1). So wurde eine etwa gleich starke immunologische Reaktion in beiden Spuren erhalten, und damit ein weiterer Hin-

weis auf die Überakkumulation der EPSP Synthase und deren Größenordnung in der adaptierten Kultur erbracht.

3.5.4. Hemmung der EPSP Synthase Aktivität durch das Antiserum

Da ein polyklonales Antiserum gegen viele verschiedene antigene Determinanten eines Enzyms gerichtet ist, können sich auch solche Antigen-Antikörper Bindungen ausbilden, die in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind oder dieses sterisch beeinflussen. Deshalb ist eine Aktivitätshemmung des Enzyms durch Inkubation mit dem Antiserum in vielen Fällen zu beobachten.

Abb.23 zeigt die Hemmung der Aktivitäten der gereinigten EPSP Synthasen aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen durch verschiedene Mengen Antiserum.

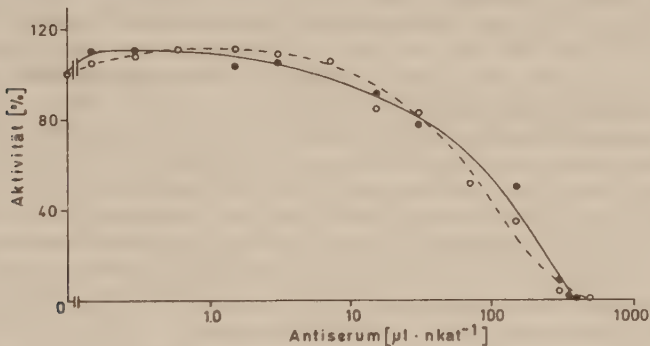


Abb.23 Hemmung der gereinigten EPSP Synthasen aus glyphosatadaptierten (O—O) und nicht adaptierten (●—●) *C.sem-pervirens* Kulturen durch polyklonales Antiserum gegen die EPSP Synthase aus adaptierten Zellen.

Beide Enzyme wurden durch gleiche Mengen Antiserum gleich stark gehemmt.

Die Hemmung war vollständig bei 400-500 µl Antiserum/nkat EPSP Synthase und betrug 50% bei etwa 100 µl Antiserum/nkat.

Auffallend war die bei beiden Versuchen feststellbare Steigerung der Aktivität über den 100%-Wert (Kontrolle ohne Antiserum) im Bereich niedriger Antiserummengen. Dieser Effekt war nicht auf

eine unspezifische Aktivierung der EPSP Synthase durch Protein zurückzuführen, wie sie in anderen Versuchen teilweise festgestellt wurde (eigene Beobachtungen). Präimmunserum hatte keinen steigernden Einfluß auf die Aktivität in kleinen Mengen und ergab keine Aktivitätshemmung in Mengen bis zu 1000 μ l/nkat EPSP Synthase. Dieser Effekt wurde aber nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die gereinigten EPSP Synthase Präparationen beider Kulturen keine Unterschiede in ihrer Reaktion mit dem Antiserum zeigten.

Die Gleichartigkeit ihrer Reaktion im Duchterlony-Test, in den beschriebenen Gelelektrophoresen sowie in ihrer Hemmung durch das Antiserum sind deutliche Hinweise auf die Identität der EPSP Synthasen aus adaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Kulturen. Berücksichtigt man zusätzlich noch die weitgehende Übereinstimmung der kinetischen Parameter beider Enzyme (Kapitel III.3.4. dieser Arbeit) und die Identität weiterer hier, (Kapitel III.3.1.-III.3.3.) und schon vorher (Leifeld, 1982; Johanning, 1983) beschriebener Charakteristika, dann ist an der Identität der EPSP Synthasen aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen von C.sempervirens kein Zweifel möglich.

Weiterhin konnte durch die Analyse der immunologischen Reaktionen der Rohextrakte gezeigt werden, daß die adaptierte Kultur deutlich mehr Kopien der sensitiven EPSP Synthase besitzt. Die Größenordnung dieser Überakkumulation wurde in einem einfachen immunologischen Versuch (Kapitel III.3.5.3) mit ungefähr 30-fach geschätzt. Dies stimmt in etwa mit der rein rechnerischen Kalkulation der Überproduktion der EPSP Synthase aus den Daten der Enzymreinigung (Kapitel III.2.2.) überein.

4. Weitere Untersuchung der EPSP Synthase aus C. sempervirens Zellkulturen

4.1. Versuche zur Feststellung der Bedeutung verschiedener funktioneller Gruppen für die Aktivität der EPSP Synthase

Die gezielte Modifikation bestimmter Aminosäureseitenketten eines Enzyms durch gruppenspezifische Reagenzien kann dazu dienen, für die Aktivität wichtige Aminosäuren zu identifizieren. In günstigen Fällen ist es möglich, aus der Beeinflussung dieser Inaktivierung durch Substrate oder Inhibitoren des Enzyms Rückschlüsse auf funktionell wichtige Aminosäurereste im aktiven Zentrum zu ziehen.

Die Inaktivierung gereinigter EPSP Synthase durch gruppenspezifische Reagenzien wurde bei Aerobacter aerogenes (Steinrücken und Amrhein, 1984b; Sost et al., 1984), bei E. coli (Krüper, 1985; Stepanek, 1986; Treffer, 1987) und bei Pseudomonas aeruginosa (Erdmann, 1986) beschrieben.

Für die folgenden Versuche wurde affinitätschromatographisch gereinigte EPSP Synthase aus adaptierten Kulturen, nach ca. 16 stündiger Dialyse gegen einen 1000-fachen Pufferüberschuß, eingesetzt.

4.1.1. Inaktivierung der EPSP Synthase durch N-Ethylmaleimid

N-Ethylmaleimid (NEM) reagiert mit Thiol- und Aminogruppen (Smyth et al., 1960; Means und Feeney, 1971); bei neutralem pH Wert, das heißt unter den hier gewählten Bedingungen, findet die Reaktion allerdings spezifisch mit Thiolgruppen statt. NEM wurde eingesetzt, da in den vorher beschriebenen Inaktivierungsversuchen mit bakteriellen EPSP Synthasen immer eine deutliche Aktivitätshemmung der EPSP Synthase durch NEM festgestellt worden war. Dies wurde als Hinweis auf die Beteiligung eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum des Enzyms gewertet und dieser könnte die geforderte schwache Säuregruppe im aktiven Zentrum der EPSP Synthase darstellen (Steinrücken und Amrhein, 1984 b).

Auch die EPSP Synthase aus C. sempervirens wurde durch NEM in ihrer Aktivität deutlich irreversibel inhibiert. Die Aktivität wurde im beobachteten Zeitraum durch 1 mM NEM fast vollständig gehemmt und $t_{1/2}$ (Zeit nach der 50% der Ausgangsaktivität verloren gegangen sind) betrug 1,2 min. (Abb. 24A). Ein unter gleichen Bedingungen durchgeführter Versuch mit gerei-

nigter EPSP Synthase aus *Petunia hybrida* Zellkulturen, die freundlicherweise von Herrn Arno Schulz zur Verfügung gestellt wurde, ergab $t_{1/2} = 0,9$ min.; die Restaktivität nach 4,5 min. betrug etwa 5% (Abb.24B).

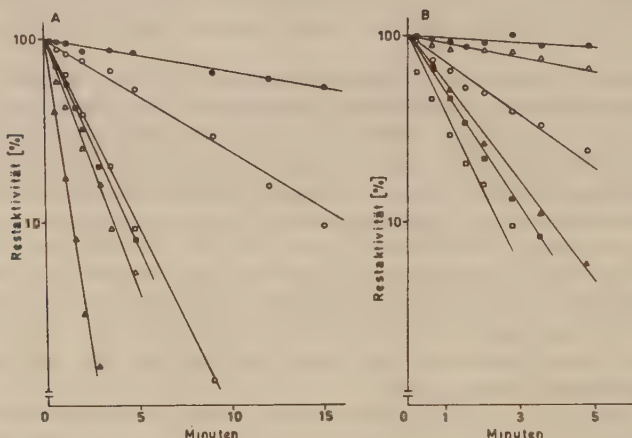


Abb.24 Zeitabhängigkeit der Inaktivierung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten *C.sempervirens* (A) und *Petunia hybrida* Kulturen (B) durch 1mM NEM (□—□), und nach zusätzlicher Vorinkubation mit 2mM PEP (■—■), mit 2mM S3P (△—△), mit 1mM EPSP (▲—▲), mit 1mM Phosphat (○—○) und 0,25mM Glyphosat (●—●)

Bei den Untersuchungen der bakteriellen EPSP Synthasen lag $t_{1/2}$ bei 1 bis 3 Minuten und die Aktivität ging nicht vollständig verloren, sondern 10-20% Restaktivität blieben erhalten (Steinrücken und Amrhein, 1984 b; Krüper, 1985). Allerdings wurde bei unterschiedlichen Bedingungen gemessen (pH Wert, Enzym- und NEM-Konzentration usw.), sodaß ein quantitativer Vergleich nicht möglich ist.

Eine Vorinkubation der EPSP Synthase aus *C.sempervirens* mit ihren Substraten und Glyphosat zeigte keine Beeinflussung der Inaktivierungskinetik durch PEP oder S3P, eine Steigerung der Inaktivierungsgeschwindigkeit durch EPSP ($t_{1/2} = 0,6$ min.); eine Erniedrigung durch Phosphat ($t_{1/2} = 5,7$ min.) und besonders drastisch durch Glyphosat ($t_{1/2}$ ca.15 min.) (Abb.24A).

Abb.24B zeigt vergleichbare Versuche mit der gereinigten EPSP Synthase aus Petunia.hybrida unter denselben Bedingungen. Es zeigte sich keine Beeinflussung durch die Vorinkubation mit PEP oder EPSP. Phosphat erniedrigte die Inaktivierungsgeschwindigkeit etwas ($t_{1/2} = 1,7$ min.). S3P hemmte allerdings hier deutlich die Inaktivierung, sodaß im Beobachtungszeitraum eine 50%ige Aktivitätsabnahme gar nicht erreicht wurde. Extrapolation führte zu einem Wert von $t_{1/2} = 7$ min.. Eine Vorinkubation mit Glyphosat zeigte auch in diesem Fall den deutlichsten Effekt auf die Inaktivierung, nämlich eine drastische Verlangsamung: nach 4 min. waren noch 87% Restaktivität (bei C.sempervirens noch 82% Restaktivität) meßbar.

Zusammenfassend läßt sich folgendes festhalten:

- Beide EPSP Synthasen wurden in gleicher Weise durch NEM drastisch inaktiviert.
- Vorinkubation mit PEP war bei beiden ohne Wirkung, während Glyphosat die Inaktivierung deutlich verlangsamte.
- Phosphat verlangsamte die Inaktivierung.
- Für EPSP und S3P ergab sich kein übereinstimmendes Bild in ihrer Beeinflussung der Inaktivierung der EPSP Synthase durch NEM.

Bei den bakteriellen EPSP Synthasen aus E.coli und Aerobacter aerogenes war übereinstimmend keine Hemmung der Inaktivierung durch S3P, PEP und EPSP und drastische Hemmung durch Glyphosat gefunden worden (Steinrücken und Amrhein, 1984b; Krüper, 1985). Beim Enzym aus Pseudomonas aeruginosa fand Erdmann allerdings keinen Einfluß von Glyphosat auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit (Erdmann, 1986).

Bei bakteriellen und pflanzlichen EPSP Synthasen, außer der von Pseudomonas aeruginosa, schützte Glyphosat wirksam vor der Inaktivierung durch NEM, während S3P und PEP keinen oder einen doch deutlich schwächeren Einfluß hatten, vor allem wenn man berücksichtigt, daß Glyphosat in einer niedrigeren Konzentration als alle Substrate eingesetzt wurde.

Unter den gewählten Bedingungen wurde Glyphosat offensichtlich stabiler als PEP an die EPSP Synthase gebunden und verhinderte so effektiver die Reaktion der Thiolgruppe eines Cysteinrestes mit NEM.

Diese Versuche lieferten weitere Hinweise auf die funktionelle Bedeutung eines Cysteinrestes für die Aktivität der EPSP Synthase von Bakterien und Pflanzen.

4.1.2. Inaktivierung durch Pyridoxalphosphat

Die Carbonylfunktion des Pyridoxalphosphats (PALP) reagiert, unter den gewählten Bedingungen, vor allem mit der freien ϵ -Aminogruppe des Lysins durch Bildung einer Schiff'schen Base. Durch die Reduktion dieser Schiff'schen Base entsteht eine C-N-Einfachbindung und so ein stabiles Lysinderivat.

Die Wirkung von PALP auf die pflanzliche EPSP Synthase war besonders interessant, da das Enzym aus E.coli schon in äquimolaren Mengen durch PALP deutlich inaktiviert wurde und gezeigt werden konnte, daß nur ein einziger Lysinrest des Enzyms mit PALP reagierte und so die Inaktivierung hervorrief (Treffer, 1987).

Die gereinigte EPSP Synthase aus C.sempervirens wurde durch PALP inaktiviert und zeigte eine Abhängigkeit dieses Effekts vom Enzym/PALP Verhältnis. Eine effektive Inaktivierung wurde aber erst bei einem Verhältnis von 1/500 erreicht: $t_{1/2}$ betrug etwa 1 min. und die Restaktivität ca. 40%.

Vorinkubation mit PEP hatte keinen Einfluß auf die Inaktivierungskinetik, aber S3P, Glyphosat und beide kombiniert hemmten die Inaktivierung fast vollständig (ohne Abbildung).

Bei Verlängerung der Dialysezeit von normalerweise 16 Stunden auf 144 Stunden ergab sich eine deutlichere Inaktivierung der EPSP Synthase durch PALP (ohne Abbildung). Dies war ein Hinweis darauf, daß nach 16 stündiger Dialyse S3P und Glyphosat noch nicht vollständig von der EPSP Synthase abdissoziiert waren.

Dieses Problem machte eine genaue Analyse der Reihenfolge der Substratbindung an das Enzym unmöglich. Ob, wie bei E.coli, Glyphosat nicht an die EPSP Synthase selbst, sondern nur an einen Enzym*S3P Komplex binden kann (Stepanek, 1986), konnte daher nicht festgestellt werden.

Andererseits war deutlich, daß die EPSP Synthase aus C.sempervirens durch PALP gehemmt wurde und dadurch erscheint es wahrscheinlich, daß ein Lysinrest für die Aktivität von essentieller Bedeutung ist.

4.1.3. SH-Gruppenbestimmung

Alle untersuchten EPSP Synthasen aus Bakterien und Pflanzen waren durch NEM inaktivierbar, was auf die Bedeutung eines Cysteinrestes für die Aktivität des Enzyms hinwies. Während bei E.coli aus der Aminosäuresequenz (Duncan et al., 1984) und durch SH-Gruppenbestimmung (Stepanek, 1986) sechs Cysteine im Enzym nachgewiesen wurden, gab es hierzu bei pflanzlichen EPSP Synthasen keine veröffentlichten Untersuchungen. Aus diesem Grund wurde versucht,

die SH-Gruppen der EPSP Synthase aus C.sempervirens zu bestimmen. Ein erster Hinweis auf das Vorhandensein von Disulfidbrücken sollte durch Aktivitätsmessungen der EPSP Synthase in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines Reduktionsmittels erhalten werden. Unter diesen Bedingungen werden Disulfidbrücken gespalten und eine Abnahme der Aktivität deutet auf die Existenz von S-S Brücken hin, die für die Aufrechterhaltung der katalytischen Funktion wichtig sind (Hirs, 1967; Königsberg, 1972).

Aktivitätsmessungen der EPSP Synthase über 24 Stunden in Anwesenheit von 0,5 M 2-Mercaptoethanol zeigten aber keine Verringerung der Aktivität im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Reduktionsmittel, und ergaben so keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Disulfidbrückenbindungen (ohne Abbildung).

Zur Quantifizierung der in den Versuchen zur SH-Gruppenbestimmung eingesetzten Enzymmengen war es notwendig, eine Proteineichgerade der EPSP Synthase aus C.sempervirens anzufertigen. Dazu wurde wie üblich der Bradfordtest verwendet.

Es zeigte sich, daß die EPSP Synthase im verwendeten Testsystem deutlich schwächer reagierte als das zur Standardisierung verwendete BSA. Eine Extinktion von 0,1 wurde im linearen Bereich der Eichgerade durch 2,5 µg BSA erhalten, während bei Verwendung gereinigter EPSP Synthase unter gleichen Testbedingungen 10,6 µg erforderlich waren.

Die Zahl der freien SH-Gruppen wurde mit Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) bestimmt (Ellman, 1959; Riddles et al., 1983; Robyt et al., 1971). Die Messung beruht auf der Bildung von TNB (2-Nitro-5-thiobenzenoesäure) aus DTNB in Anwesenheit eines Thiolatanions und erfolgt photometrisch.

Die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ergab 13700 Mol/cm². Die Anwesenheit von 8 M Harnstoff beeinflusste diesen Wert nicht (ohne Abbildung).

Abb.25 zeigt die Quantifizierung der SH-Gruppen pro mol EPSP Synthase.

Die Kurven 1 und 2 zeigen zwei Messungen unter nicht denaturierenden Bedingungen, wobei 1,8 bzw. 1,7 SH-Gruppen pro EPSP Synthasemolekül nachgewiesen wurden.

Eine Auffaltung des Enzyms unter denaturierenden Bedingungen könnte im Inneren verborgene SH-Gruppen, die unter nicht denaturierenden Bedingungen nicht meßbar wären, einer Reaktion mit DTNB zugänglich machen (Krüper, 1985).

Abb.25 zeigt als Kurven 3 und 4 die SH-Gruppenbestimmung der EPSP Synthase in Anwesenheit von 8 M Harnstoff.

Die Reaktion lief zwar etwas schneller ab, da die SH-Gruppen unter diesen Bedingungen leichter zugänglich waren, die Endwerte aber waren mit 1,8 bzw. 2,0 nicht höher als unter nicht denaturierenden Bedingungen.

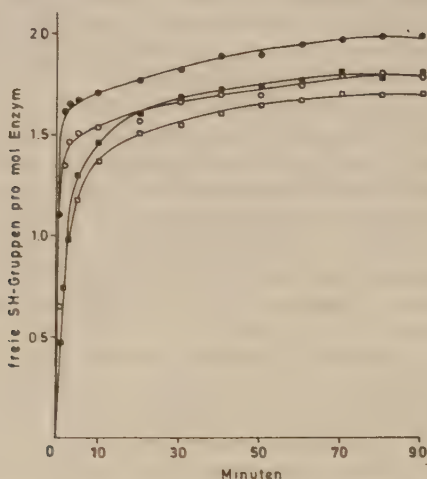


Abb. 25 Bestimmung der freien SH-Gruppen der EPSP Synthase glyphosatadaptierter *C. semperivirens* Kulturen:
 -unter nicht denaturierenden Bedingungen: 1 (■) und 2 (□)
 -unter denaturierenden Bedingungen: 3 (○) und 4 (●)
 Die Kurven 1 und 2 bzw. 3 und 4 sind Doppelbestimmungen unter jeweils identischen Bedingungen.

Eine quantitative Bestimmung der vorhandenen Disulfidbrücken nach der Methode von Robyt et al. (1971) ergab keine eindeutigen Resultate, deutete aber auf das Fehlen von S-S-Bindungen bei der EPSP Synthase hin.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die EPSP Synthase aus *C. semperivirens* wahrscheinlich keine Disulfidbrücken enthält, eine Eigenschaft, die auch die EPSP Synthase aus *E. coli* aufweist (Schulz, 1986).

Zwei SH-Gruppen pro Enzymmolekül konnten in der EPSP Synthase aus *C. semperivirens* nachgewiesen werden, dagegen enthält das Enzym aus *E. coli* sechs Cysteine (Duncan et al., 1984).

Bei Anwesenheit von S3P oder Glyphosat konnten mit der SH-Gruppenbestimmung nach Ellman allerdings bei der EPSP Synthase von E.coli nur zwei der vorhandenen sechs Cysteine nachgewiesen werden (Krüper, 1985). Die Ursache dafür lag in der Tatsache, daß die EPSP Synthase affinitätschromatographisch gereinigt worden war und für die EPSP Synthase aus E.coli gezeigt werden konnte, daß S3P und Glyphosat während einer Dialyse nur sehr langsam vom Enzym abdissoziieren und auch innerhalb von mehreren Tagen nicht quantitativ zu entfernen waren (Stepanek und Amrhein, unveröffentlicht). Von der EPSP Synthase gebundenes S3P und/oder Glyphosat war deshalb die Ursache der Unterbestimmung der SH-Gruppen des Enzyms.

Dies könnte auch für die EPSP Synthase aus C.sempervirens in ähnlicher Weise zutreffen, wie die Versuche zur Inaktivierung durch PALP bei verschiedenen langen Enzymdialysezeiten nahelegen. Dadurch könnte die SH-Gruppenbestimmung und der Einfluß der Substrate auf die Inaktivierung durch gruppenspezifische Reagenzien beeinflusst worden sein.

Andererseits unterscheiden sich bakterielle und pflanzliche EPSP Synthasen in vielen Eigenschaften, so daß eine einfache Übertragung der Charakteristika von bakteriellen auf pflanzliche EPSP Synthasen nicht statthaft ist.

Zwei Schwierigkeiten verhinderten eine genaue Analyse dieses Problems bei der EPSP Synthase der C.sempervirens Kultur:

- Die für eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstanten erforderliche Menge an gereinigtem Enzym war aus praktischen Gründen nicht zu isolieren.
- Im Gegensatz zu den Bakterienkulturen mußten die C.sempervirens Kulturen in glyphosathaltigem Medium angezogen werden, um die gesteigerte EPSP Synthase Menge zu produzieren. Deshalb könnten auch ohne Beteiligung der Phosphocellulose-Reinigung schwer abdissoziierbares S3P und Glyphosat an das Enzym gebunden gewesen sein.

Ein Hinweis auf das zuletzt genannte Problem ergab sich bei einer konventionellen Reinigung der EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten Kulturen. Nach einer Ammoniumsulfat-Fällung, Entsalzen über Sephadex G-25 und Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose, wurde ein Aliquot auf eine Mono Q HR 5/5 Säule (HPLC) aufgegeben.

Das Elutionsprofil ist in Abb.26A dargestellt.

Es zeigten sich drei Aktivitätsmaxima, von denen das mittlere die größte EPSP Synthase Aktivität besaß und bei einer KCl Konzentration von 0,13 M eluierte. Die beiden anderen, kleineren Maxima

eluierten bei KCl Konzentrationen von 0,08 M bzw. 0,22 M.

Ein zweites Aliquot der Probe nach DEAE-Cellulose wurde mit S3P und Glyphosat (beides 0,1 mM) inkubiert. Das Elutionsprofil (Abb.26B) zeigt, daß die beiden kleineren Aktivitätsmaxima vollständig verschwunden waren und die gesamte EPSP Synthese in einer Form vorlag, die dem Hauptmaximum des in Abbildung 26A dargestellten Versuchs entsprach, denn das Enzym eluierte hier bei einer Konzentration von 0,11 M KCl.

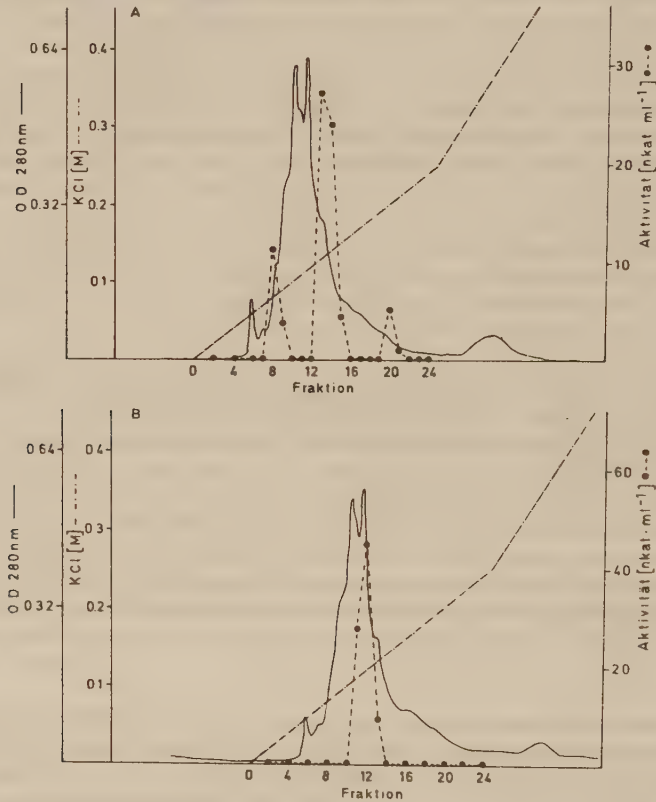


Abb.26 A.Chromatographie teilgereinigter EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten *C.sempervirens* Kulturen an Mono Q. Die Elution erfolgte mit KCl.
B.Chromatographie derselben Enzymprobe nach Vorinkubation mit 0,1mM S3P und 0,1mM Glyphosat für 10 min. bei +4°C.

Die drei Formen des Enzyms unterschieden sich nur durch die Bindung von S3P und/oder Glyphosat und PEP.

Weitere Versuche zur Identifizierung der Liganden an den drei Enzymformen konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Deutlich wurde aus diesem Versuch allerdings das Problem der Identifizierung und Reinigung einer substrat-/glyphosاتفreien EPSP Synthase aus den adaptierten pflanzlichen Zellkulturen.

4.2. Subzelluläre Lokalisation der EPSP Synthase in C. sempervirens Zellen

Erste Hinweise auf die Lokalisation des Shikimatweges in Pflanzen erbrachten Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem CO₂ und Shikimat. Isolierte Spinatchloroplasten waren in der Lage, diese markierten Vorstufen in aromatische Aminosäuren einzubauen (Bickel et al., 1978; Bickel und Schultz, 1979).

In einer Reihe von weiteren Untersuchungen konnte durch Trennung von Zellorganellen mittels Dichtegradientenzentrifugation für verschiedene Pflanzen gezeigt werden, daß die Enzyme des Shikimatweges in den Plastiden lokalisiert sind, wenngleich aber auch für einige cytoplasmatische Isoenzyme gefunden wurden (Feierabend und Brassel, 1977; Saijo und Takeo, 1979; Fiedler und Schultz, 1985; Mousdale und Coggins, 1985; Joop, 1985).

Ob der Shikimatweg ganz, oder zumindest partiell auch im Cytoplasma der Pflanzenzelle ablaufen kann, bleibt weiterhin umstritten.

Aus jünster Zeit gibt es auch einen weiteren Ansatzpunkt als Hinweis auf die plastidäre Lokalisation, zumindest für die EPSP Synthase.

Die EPSP Synthasen aus Petunia hybrida und C. sempervirens Zellkulturen werden als Präkursoren ("precursor") mit höherem Molekulargewicht als das reife Enzym synthetisiert (della-Cioppa et al., 1986; Holländer-Czytko und Amrhein, 1986). Dies weist darauf hin, daß die EPSP Synthase ein kernkodiertes Enzym ist, welches in der Präkursor-Form ein Transportpeptid ("transit peptide") beinhaltet, das für den Transport des Enzyms durch die Plastidenmembran benötigt und danach abgespaltet wird (Ellis, 1981). Della-Cioppa et al. bewiesen in ihrer Untersuchung die Bedeutung der N-terminalen Prä-sequenz für die Aufnahme der EPSP Synthase in die Chloroplasten.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die subzelluläre Lokalisation der EPSP Synthase in der heterotrophen

C.sempervirens Zellkultur durch isopyknische Zentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten festzustellen.

Die Ergebnisse von zwei typischen Organelltrennungen mit dieser Methode sind in Abb.27A, für die glyphosatadaptierte Kultur, und in Abb.27B, für die nicht adaptierte Kultur, dargestellt.

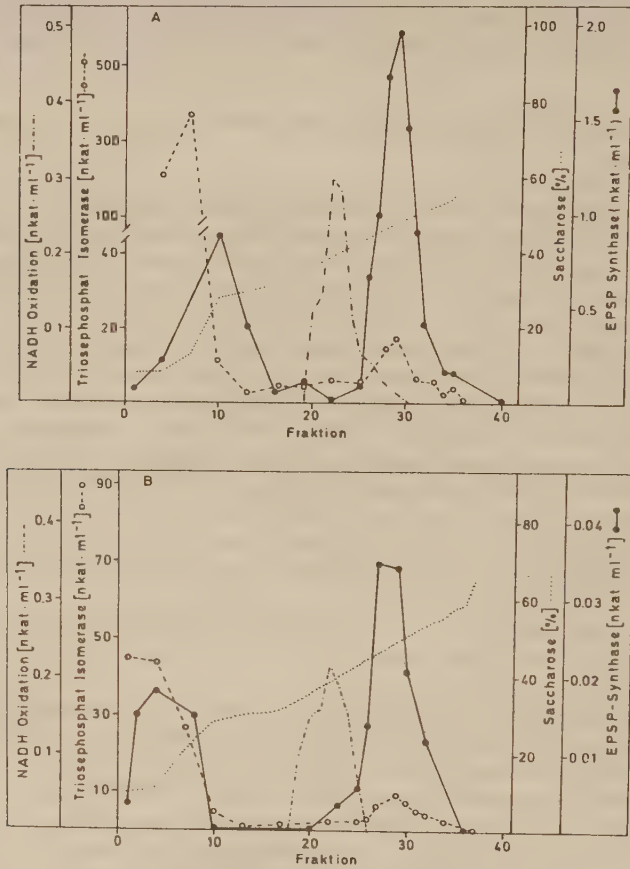


Abb.27 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von Organellen glyphosatadaptierter (A) und nicht adaptierter (B) C.sempervirens Zellen. Die Mitochondrien wurden anhand ihrer NADH Oxidationsfähigkeit, die Plastiden durch ihre Triosephosphat-Isomerase Aktivität identifiziert.

Neben diesen Trennungen auf linearen Gradienten wurden auch Stufengradienten benutzt, die aber keine bessere Auftrennung ergaben und deshalb hier nicht abgebildet sind.

Die Lage der Mitochondrienbande im Gradienten wurde aufgrund ihrer durch Cyanid hemmbaren NADH Oxidationsfähigkeit und die der Plastiden durch ihre Triosephosphat-Isomerase (TIM) Aktivität identifiziert. Allerdings ist die TIM als Markerenzym für Plastiden nur bedingt geeignet, da ein großer Teil der Gesamtaktivität der TIM auf ein cytoplasmatisches Isoenzym zurückzuführen ist (Feierabend und Brassel, 1977).

PEP-Carboxylase, ein Leitenzym des cytoplasmatischen Zellanteils, konnte immer nur im Überstand der Gradienten gemessen werden. Deshalb wurde auf eine Darstellung dieser Messungen in den Abbildungen verzichtet.

Katalase Aktivität als Markerenzym für Mikrobodies konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Abb.27 zeigt in Teil A für die glyphosatadaptierte und in Teil B für die nicht adaptierte Kultur ein im wesentlichen übereinstimmendes Bild. Die EPSP Synthase lag zum überwiegenden Teil partikulär vor, wobei die Dichte dieser Partikel ca. 50%iger Saccharose entsprach. Mit der EPSP Synthase kosegregierte in beiden Trennungen TIM, wodurch diese Partikel als Plastiden identifiziert werden konnten. In der weniger dichten Mitochondrienfraktion fand sich keine EPSP Synthase.

Die im Überstand meßbare EPSP Synthase Aktivität ist auf freigesetztes Enzym aus zerstörten Plastiden und vielleicht auch auf cytoplasmatische EPSP Synthase selbst zurückzuführen.

Die Existenz eines cytoplasmatischen Isoenzym der EPSP Synthase konnte durch diesen Versuchsansatz nicht untersucht werden, da kein geeignetes Markerenzym der Plastiden bekannt ist, das nur in diesen Organellen vorhanden ist und damit eine Quantifizierung der Plastidenzerstörung durch den Zellaufschluß erlauben würde.

Festhalten kann man aber, daß die EPSP Synthase in glyphosatadaptierten und nicht adaptierten *C. sempervirens* Zellen ganz, oder zumindest zum überwiegenden Teil, in den Plastiden lokalisiert ist.

5. Molekulare Grundlagen der Glyphosattoleranz der C.sempervirens Zellkultur

Durch die Feststellung der Identität der EPSP Synthasen aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Zellkulturen wurde eine Enzymakkumulation als Toleranzmechanismus für die adaptierte Kultur bewiesen. Damit stellte sich zwangsläufig die Frage nach den molekularen Ursachen der EPSP Synthase Überproduktion in dieser Kultur. Konkret sollte überprüft werden, ob eine Amplifikation des für EPSP Synthase kodierenden Gens die Ursache der Enzymakkumulation wäre.

Für Genamplifikation als Ursache einer Enzymüberproduktion, bedingt durch den Einfluß von Inhibitoren, gibt es bei Säugerzellkulturen viele gut untersuchte Beispiele (Stark und Wahl, 1984).

Außerdem konnte bei einer glyphosattoleranten Petunia hybrida Zellkultur die EPSP Synthase Überproduktion eindeutig auf eine Amplifikation des entsprechenden Gens zurückgeführt werden (Shah et al., 1986).

Zur Quantifizierung der EPSP Synthase Gene in beiden Kulturen wurde methodisch so vorgegangen, daß zunächst das N-terminale Ende der EPSP Synthase sequenziert und daraus die entsprechende kodierende DNA Sequenz abgeleitet wurde.

Ein Teilstück dieser Sequenz wurde ausgewählt, das groß genug war, um spezifisch für die EPSP Synthase zu sein, und eine Aminosäuresequenz mit möglichst wenigen Kodonmöglichkeiten ("wobble"-Funktionen) determinierte.

Eine diesem Teilstück der m-RNA aus 17 Nukleotiden komplementäre Sequenz wurde aufgestellt und eine geeignete Oligonukleotidfamilie wurde entsprechend synthetisiert.

Diese Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert und als Sonde für die Identifizierung und Quantifizierung des EPSP Synthase Gens verwendet.

Hochmolekulare DNA (größer 20 kb) wurde aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Kulturen gereinigt und die Spezifität des Oligonukleotids zur Erkennung des EPSP Synthase Gens überprüft. Anschließend wurde eine vergleichende Quantifizierung der für EPSP Synthase spezifischen Sequenzen aus beiden Kulturen durchgeführt.

5.1. Reinigung der EPSP Synthase durch HPLC

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteinsequenzierung ist die Reinheit der zu untersuchenden Probe. Deshalb wurde die affinitätschromatographisch gereinigte EPSP Synthase aus *C. sempervirens* einem weiteren Reinigungsschritt, einer Anionenaustauscherchromatographie an Mono Q HR 5/5 in einem HPLC System unterzogen.

Etwa 250 µg des gereinigten Enzyms wurden auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen KCl-Gradienten (0-0,5 M KCl) eluiert. Abb.28 zeigt das Elutionsprofil der Säule.

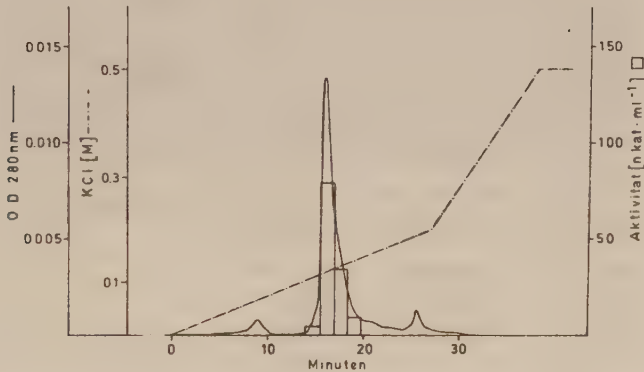


Abb.28 Chromatographie gereinigter EPSP Synthase aus glyphosat-adaptierten *C. sempervirens* Zellen an Mono Q. Die Elution erfolgte mit einem KCl-Gradienten

Die Proteinmessung (OD 280 nm) offenbarte drei Maxima, von denen nur das mittlere EPSP Synthase Aktivität besaß und bei einer KCl Konzentration von 0,12 M eluierte.

Vier Fraktionen dieses Peaks wurden manuell aufgefangen. Alle besaßen die gleiche spezifische Aktivität von circa 540 nkat/mg Protein, wobei sich keine Steigerung gegenüber dem vorhergehenden Schritt, der Affinitätschromatographie, zeigte.

Die EPSP Synthase aus den Fraktionen 3-6 wurde zusätzlich gel-chromatographisch auf ihre Reinheit überprüft (Abb.29). Trotz der Auftragung großer Proteinmengen (bis 40 µg) konnte keine Verunreinigung mit Fremdprotein festgestellt werden.

Für alle weiteren Versuche wurde die EPSP Synthase aus Fraktion 4 verwendet; diese enthielt 150 µg Protein.

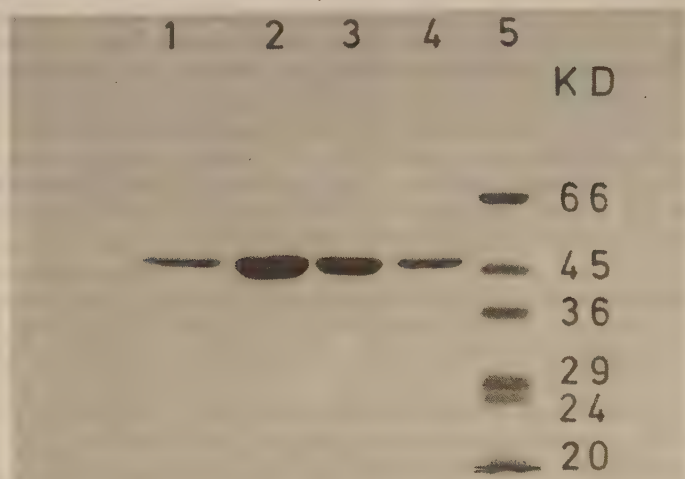


Abb. 29 SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) der gereinigten EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten *C.sempervirens* Kulturen nach Chromatographie an Mono Q.

Spur 1	Fraktion 3 (10µg)
Spur 2	Fraktion 4 (40µg)
Spur 3	Fraktion 5 (30µg)
Spur 4	Fraktion 6 (15µg)

In den beiden abtrennbaren, kleineren Maxima konnte weder EPSP Synthase Aktivität noch Protein im Bradford Test festgestellt werden. Möglicherweise handelte es sich dabei um Artefakte. Die EPSP Synthase aus Fraktion 4 wurde mit Säure gefällt, getrocknet und danach für die Feststellung der Aminosäurezusammensetzung und die Proteinsequenzierung eingesetzt.

5.2.PTC-Aminosäureanalyse der EPSP Synthase

Die Aminosäurezusammensetzung der EPSP Synthase wurde durch PTC-Aminosäureanalyse festgestellt (Heinrikson und Meredith, 1984). Die Proben wurden mit Säure hydrolysiert, die freigesetzten Aminosäuren an PITC (Phenylisothiocyanat) gekoppelt und als PTC (Phenylthiocarbamoyl)-Derivate identifiziert und quantifiziert.

Tabelle 5. zeigt die Aminosäurezusammensetzung der EPSP Synthase aus C.sempervirens und aus E.coli (Duncan et al., 1984). Die dargestellten Angaben sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, wobei jeweils etwa 3 pmol der gereinigten EPSP Synthase eingesetzt wurden.

Aminosäure	Aminosäurezusammensetzung pro Mol Enzym	
	<u>C.sempervirens</u>	<u>E.coli</u>
ASX	22,4	41,9
GLX	29,1	38,8
SER	24,7	19,7
GLY	38,8	42,8
THR	34,9	31,1
ALA	41,1	44,1
HIS	4,0	8,1
PRO	24,9	18,1
ARG	22,8	17,2
TYR	9,1	13,1
VAL	32,3	21,7
MET	11,0	13,6
CYS	n.b.	4,9
TRP	n.b.	n.b.
ILE	13,5	24,2
LEU	40,9	48,0
PHE	11,8	13,2
LYS	30,0	17,0

Tab.5. Aminosäurezusammensetzung der EPSP Synthase aus C.sempervirens (n.b.= nicht bestimmt) und aus E.coli (entnommen von: Duncan et al., 1984)

Die EPSP Synthase aus C.sempervirens besteht aus mindestens 391 Aminosäuren. Diese Zahl ist allerdings eine Unterbestimmung, da der Cystein und Tryptophangehalt des Enzyms mit dieser Methode nicht bestimmt werden konnte.

Damit ist das Enzym etwa genauso groß wie die EPSP Synthase aus Petunia hybrida, die aus 444 Aminosäuren zusammengesetzt ist (Shah et al., 1986).

la typhimurium (Stalker et al., 1985), die untereinander deutliche Homologie aufweisen, konnte in dieser kurzen Teilsequenz nicht festgestellt werden.

5.4. Quantifizierung der EPSP Synthase kodierenden DNA Sequenzen in glyphosatadaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Zellkulturen

Bei ihren Versuchen zur Klärung der molekularen Ursachen der Glyphosattoleranz bei einer Petunia hybrida Zellkultur waren Shah et al. so vorgegangen, daß sie drei Oligonukleotidfamilien synthetisierten, die der kodierenden Sequenz des Hexapeptids (Aminosäuren 8-13) komplementär waren. Nur eine, EPSP-1, erwies sich in Hybridisierungsexperimenten mit der polyadenylierten m-RNA der glyphosatadaptierten Kultur als geeignet zur Identifizierung der für EPSP Synthase kodierenden Sequenzen (Shah et al., 1986). Daher wurde für die Identifizierung und Quantifizierung der für EPSP Synthase kodierenden Gene aus C.sempervirens eine Oligonukleotidfamilie derselben Zusammensetzung und Sequenz synthetisiert und verwendet, wie sie auch Shah et al. bei ihrer Petunia hybrida Kultur erfolgreich eingesetzt hatten.

Diese Sequenz umfasste 17 Nukleotide und 32 verschiedene mögliche kodierende Sequenzen für das Peptid wurden damit abgedeckt.

Abb.31 zeigt das ausgewählte Hexapeptid aus der Sequenz des N-terminalen Endes der EPSP Synthase aus C.sempervirens; darunter die kodierende Sequenz dieses Peptids und die entsprechende komplementäre Sequenz des synthetisierten Oligonukleotids.

Protein	Gln 13	Pro 14	Ile 15	Lys 16	Glu 17	Ile 18
DNA	5'-CA ^A _G	CC ^C _A T G	ATC ^T _A	AA ^A _G	GA ^A _G	ATC ^T _A -3'
Oligo- nukleotid	3'-GT ^C _T	GG ^A _G	TA ^A _G	TT ^C _T	CT ^C _T	TA-5'

Abb.31 Die Sequenz des ausgewählten Peptids, der entsprechenden kodierenden DNA und der synthetisierten Oligonukleotidfamilie.

Die Oligonukleotide wurden durch Phosphorylierung mit radioaktivem γ ^{32}P -ATP an ihrer freien 5'-OH-Gruppe durch das Enzym T₄-Polynucleotidkinase markiert, über eine kleine Gelfiltrations-säule gereinigt und so bei den Hybridisierungsexperimenten eingesetzt (Maniatis et al., 1982).

5.4.1. Isolierung und Restriktionsanalyse der chromosomalen DNA aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen.

Hochmolekulare DNA wurde aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Zellkulturen isoliert und gereinigt (Murray und Thompson, 1980).

Aus 1 g gefriergetrockneter Zellen konnten auf diese Weise circa 200-300 μg gereinigte DNA gewonnen werden.

Es wurden nur DNA Proben verwendet, deren Reinheit (Verhältnis OD 260/OD 280 einen Faktor von 1,7-1,9 aufwies (siehe II.17.1.)). Die DNA Menge der Proben wurde zusätzlich zur photometrischen Bestimmung überprüft durch vergleichende Fluoreszenzmessungen nach Zugabe von Ethidiumbromid zu verschiedenen DNA Mengen der Proben und eines Standards (ohne Abbildung) (Maniatis et al., 1982).

Definierte DNA Mengen wurden mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (Eco RI, Bam HI, Hind III) in geeigneten Puffern, gemäß Herstellerangaben, vollständig geschnitten. Die Fragmente wurden durch Agarose-Flachbettgelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Als Marker wurde Hind III geschnittene lambda-DNA verwendet.

Nach Denaturierung und Neutralisierung der DNA-Fragmente im Gel wurden diese durch Southern Blotting auf Nitrocellulose übertragen (Southern, 1975). Die Positionen der Markerbanden wurde durch eine indirekte DNA Färbungsmethode ermittelt (Bülow und Link, 1986). Durch Hybridisierung mit dem γ ^{32}P -markierten Oligonukleotid wurde die Lage und Menge des Fragmentes, das die komplementäre DNA Sequenz enthielt, festgestellt.

Abb.32 zeigt typische Restriktionsmuster von DNA aus glyphosatadaptierten Zellen (Spur 1 und 3) und nicht adaptierten Zellen (Spur 2 und 4). Pro Spur wurde 1 μg DNA aufgetragen, die mit Eco RI (Spur 1 und 2) oder mit Bam HI (Spur 3 und 4) vollständig geschnitten worden war.

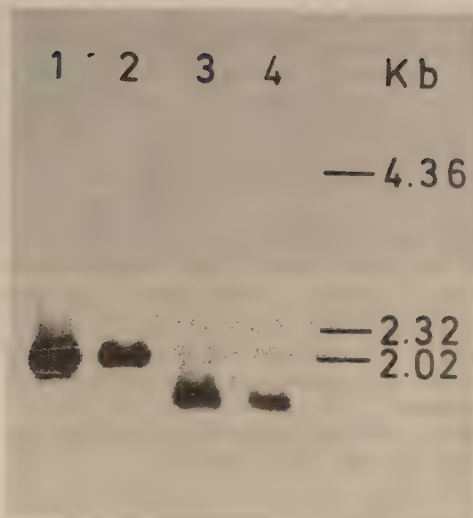


Abb.32 Autoradiographie eines Agarosegels (0,5% Agarose).
 Pro Spur wurde je 1µg DNA aus glyphosatadaptierten (Spur 1 und 3) und nicht adaptierten (Spur 2 und 4) *C.sempervirens* Zellen aufgetragen.
 Die DNA war vorher mit Eco RI (Spur 1 und 2) und mit Bam HI (Spur 3 und 4) restringiert worden.
 Die DNA Fragmente wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert.

In jeder Spur war nach Hybridisierung nur eine Bande sichtbar. Dadurch wurde sichergestellt, daß die Hybridisierung des Oligonukleotids mit dem N-terminalen Ende der EPSP Synthase unter den gewählten Bedingungen spezifisch war. Die Lage der Banden bei Verwendung desselben Restriktionsenzym war für die DNA aus den beiden Kulturen identisch.

Die Größe der hybridisierenden Fragmente betrug bei Verwendung von Eco RI 2,0 kb, Bam HI 1,3 kb und Hind III 9,6 kb (letzteres ohne Abbildung).

Ein Vergleich der Intensitäten der Banden zur Quantifizierung der EPSP Synthase Gene in beiden Kulturen zeigte, daß die Unterschiede in keinem Fall so groß waren, wie es aufgrund der Diffe-

renz auf Proteinebene (ca. 30-40 fach) zu erwarten gewesen wäre. Andererseits schien die Hybridisierung in den DNA Präparationen aus der glyphosatadaptierten Kultur (Spur 1 und 3) intensiver als die der nicht adaptierten Kultur zu sein. Hierbei ist anzumerken, daß in anderen Versuchen der Unterschied bei der Hybridisierung der DNA beider Kulturen geringer war als im hier dargestellten Versuch (Abb.32).

Zur eindeutigen Quantifizierung der Kopienzahl der EPSP Synthase Gene in beiden Kulturen wurde eine Dot-Blot Analyse durchgeführt. Dies war möglich, da das Oligonukleotid spezifisch nur mit den EPSP Synthase kodierenden Sequenzen hybridisierte (Abb.32). Die Quantifizierung durch Analyse von Restriktionsmustern ist technisch aufwendiger und müsste im vorliegenden Fall statistisch abgesichert werden. Deshalb wurde die weniger aufwendige Methode der Dot-Blot Analyse mit ungeschnittener DNA angewendet.

5.4.2. Dot-Blot Analyse mit ungeschnittener DNA

Die DNA Proben aus beiden Kulturen und eine als Kontrolle für unspezifische Hybridisierung verwendete Heringssperma-DNA wurden durch Ultraschallbehandlung geschert und einzelsträngig gemacht. Danach wurden jeweils verschiedene Mengen (0,5-2,5 µg) der einzelnen Proben in einer Dot-Blot Apparatur direkt auf Nitrocellulose aufgetragen und immobilisiert.

Die an die Nitrocellulose gebundene DNA wurde dann mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert. Die Bereiche mit gebundener DNA wurden aus der Nitrocellulose ausgestanzt und ihre Radioaktivität gemessen.

Abb.33 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs gemittelt aus jeweils zwei DNA Aufarbeitungen glyphosatadaptierter und nicht adaptierter Zellen. Die Heringssperma DNA Kontrolle wurde jeweils abgezogen.

Aufgrund der nicht signifikanten Abweichungen der Meßwerte aller korrespondierenden Bestimmungen ist eindeutig ableßbar, daß die DNA aus den glyphosatadaptierten Zellen mit dem Oligonukleotid quantitativ genauso hybridisiert, wie eine gleiche DNA Menge aus den nicht adaptierten Zellen.

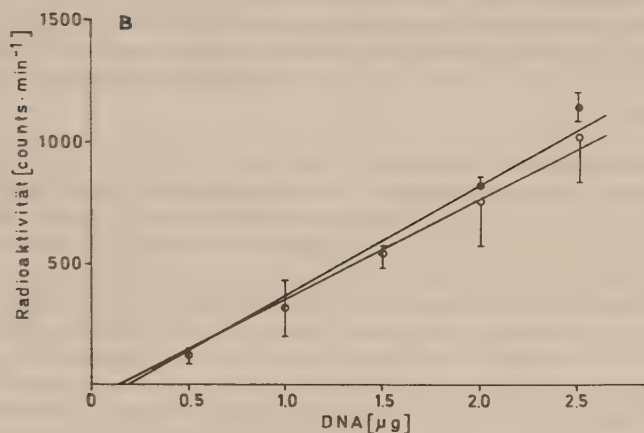
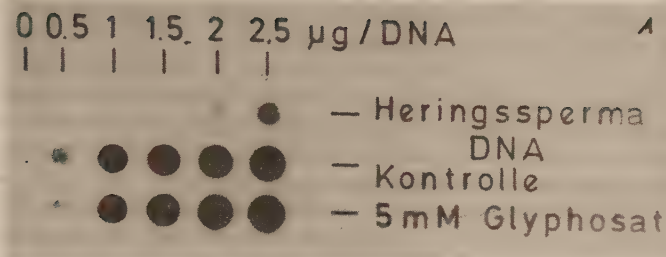


Abb.33 Dot-Blot Analyse ungeschnittener DNA aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten *C.sempervirens* Zellen.

A.Dot-Blots nach Autoradiographie

B.Quantitative Analyse der DNA aus adaptierten (○—○) und nicht adaptierten Zellen (●—●).

Es wurden je zwei voneinander unabhängige DNA Aufarbeitungen für jede der beiden Kulturen durchgeführt und gemittelt.

Dies bedeutet, daß die Zellen aus beiden Kulturen die gleiche Anzahl von EPSP Synthase Genkopien besitzen, also keine Genamplifikation als Ursache für die EPSP Synthase Überproduktion der glyphosatadaptierten Zellen vorliegt.

IV. Diskussion

Im Jahr 1983 gelang Amrhein et al. die Selektion einer glyphosattoleranten Zellkultur von Corydalis sempervirens durch schrittweisen Transfer glyphosatsensitiver Zellen in Medium mit steigenden Glyphosatkonzentrationen.

Wie schon einleitend dargestellt wurde sind verschiedene Toleranzmechanismen gegenüber Inhibitoren möglich und bei vielen Organismen beschrieben.

Eine reduzierte Aufnahme des Herbizids Glyphosat wurde, soweit bekannt, für keinen Organismus nachgewiesen. Nafziger et al. fanden 1984 vielmehr keinen Unterschied in der Aufnahme von ^{14}C -Glyphosat bei glyphosatadaptierten und nicht adaptierten Daucus carota Zellkulturen.

Metabolische Resistenz, das heißt für den Fall einer kompetitiven Hemmung die Überwindung der Inhibition durch Akkumulation des mit dem Inhibitor konkurrierenden Substrates (Christopherson und Duggleby, 1983), konnte bei glyphosattoleranten Organismen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Durch Glyphosatbehandlung geben Bakterien S3P ins Medium ab und Pflanzen akkumulieren freie Shikimisäure (Amrhein et al., 1983), aber beide Verbindungen konkurrieren nicht mit Glyphosat um dieselbe Bindungsstelle an der EPSP Synthase.

Hohe PEP Konzentrationen könnten eine metabolische Resistenz bewirken, aber PEP akkumuliert unter Glyphosateinfluß in pflanzlichen Zellkulturen nicht (Amrhein, unveröffentlicht).

Die Metabolisierung von Herbiziden ist vielfach untersucht und beschrieben worden. Herbizide können in Pflanzen zum Beispiel durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse, Alkylierung, Acylierung und Konjugation mit Glutathion, anderen Thiolen, Aminosäuren und Zuckern strukturell verändert und damit wirkungslos gemacht werden (zusammenfassende Darstellung: Matzios und Penner, 1982).

Glyphosat dagegen kann, soweit bekannt, von keiner Pflanze abgebaut oder metabolisiert werden, sondern bleibt nach der Aufnahme durch die Pflanzen unverändert aktiv (Putnam, 1976; Gottrup et al., 1976).

Dagegen wird Glyphosat im Boden durch Bakterien relativ schnell abgebaut, wobei Aminomethylphosphonat (AMPA) entsteht (Rueppel et al., 1977).

In den letzten Jahren wurden Bakterien isoliert, die Glyphosat

abbauen können. Pseudomonas PG 2982 (Jacob et al., 1985; Shinabarger und Braymer, 1986) und Athrobacter sp. GLP-1 (Pipke et al., 1987) bauen Glyphosat zu Glycin, Phosphat und einer C₁-Einheit ab, wenn sie in phosphatfreiem Medium angezogen werden. Da sie aber in Anwesenheit von Phosphat kein Glyphosat abbauen, dürften sie für den Metabolismus im Boden nicht relevant sein. Hierfür käme vielleicht Flavobacterium sp. in Frage, welches auch in Anwesenheit von Phosphat Glyphosat zu AMPA umzusetzen vermag (Balthazor und Kallas, 1986).

Diese drei dargestellten Mechanismen bewirken Toleranz gegenüber einem Inhibitor ohne daß eine Veränderung, die das Zielenzym des Inhibitors selbst betrifft, vorliegt.

In keinem Fall konnte die Glyphosattoleranz pflanzlicher Zellen auf einen solchen Mechanismus zurückgeführt werden.

1983 stellten Amrhein et al. fest, daß die schrittweise Adaptation der C. sempervirens Zellkulturen an Wachstum in Medium mit 5 mM Glyphosat mit einer 26-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase im Rohextrakt und einer 87-fachen Akkumulation von Shikimat verbunden war.

Dieser Anstieg der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase bei der glyphosatadaptierten Kultur konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (III.1.1.).

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß sich beide Kulturen in ihrem Wachstumsverhalten nicht unterschieden und vor allem identische Verdopplungszeiten von 48 Stunden hatten (III.1.1.). Smart et al. stellten 1985 durch Versuche zur Wachstumsinhibition beider Kulturen mit Glyphosat fest, daß die adaptierten Zellen etwa 100-fach toleranter gegenüber dem Hemmstoff waren als die nicht adaptierten.

Die spezifische Aktivität der EPSP Synthase im Rohextrakt betrug bei den sensitiven C. sempervirens Kulturen 0,23 - 0,52 nkat/mg Protein und bei den toleranten 7,2 - 12,8 nkat/mg Protein. Dies bedeutete eine 30 - 40 fache Steigerung im Durchschnitt aller durchgeführten Messungen (eigene Messungen).

Fünf andere Enzyme des Shikimatweges (DAHP Synthase, 3-Dehydrochinasäure-Dehydratase, Shikimat-Dehydrogenase, Shikimat-Kinase und Chorismat-Mutase) zeigten dagegen keine signifikanten Steigerungen ihrer spezifischen Aktivität bei der glyphosattoleranten C. sempervirens Zellkultur (Smart et al., 1985).

Neben der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kultur sind noch weitere glyphosatadaptierte Zellkulturen beschrieben worden.

Für eine glyphosattolerante Daucus carota Kultur wurden eine 52-fache Toleranzerhöhung und eine 12-fache Steigerung der spezifischen EPSP Synthase Aktivität ermittelt (Nafziger et al., 1984).

Glyphosatadaptierte Petunia hybrida Zellkulturen zeigten eine 15 - 20 fache Erhöhung der spezifischen EPSP Synthase Aktivität (Steinrücken et al., 1985).

Aufgrund der Übereinstimmenden Feststellung gesteigerter EPSP Synthase Aktivität kommt für die Erklärung der Glyphosattoleranz pflanzlicher Zellkulturen nur ein Mechanismus in Frage, der Zielenzym (EPSP Synthase) bezogen ist.

Zwei verschiedene derartige Mechanismen sind denkbar:

- Das Vorliegen eines mutativ veränderten Enzyms, das inhibitorinsensitiv ist.
- Die Akkumulation eines inhibitorsensitiven Enzyms.

Die Existenz von insensitiven Zielenzymen ist in einigen Fällen als Ursache von Toleranz gegenüber Herbiziden nachgewiesen worden.

Zum Beispiel bedingt eine strukturell modifizierte Acetolactat Synthase bei einer Reihe von toleranten Organismen, daß Sulfonylharnstoffe nicht mehr an das Enzym binden können (Chaleff und Mauvais, 1984; La Rossa und Schloss, 1984; Ray, 1986).

Glyphosatin-sensitive EPSP Synthasen aus Pflanzen sind nicht bekannt, bei Bakterien aber in einigen Fällen beschrieben worden.

Salmonella typhimurium Mutanten besitzen eine veränderte EPSP Synthase, die glyphosatin-sensitiv ist (Comai et al., 1983) und sich vom glyphosatin-sensitiven Enzym nur durch den Austausch einer einzigen Aminosäure unterscheidet. An der Position 101 der EPSP Synthase befindet sich bei der Mutante ein Serin anstelle eines Prolins (Stalker et al., 1985). Dies wurde durch Klonierung der entsprechenden Gene und Bestimmung ihrer Nukleotidsequenz ermittelt.

Durch Selektion konnte eine Aerobacter aerogenes Mutante isoliert werden, die ebenfalls eine glyphosatin-sensitive EPSP Synthase hat (Sost et al., 1984; Schulz et al., 1984). Dieses Enzym hat eine deutlich verminderte Affinität zu S3P und vor allem zu PEP und ist weniger stabil als das sensitive Enzym des Wildtyps (Schulz, 1986).

Einige Beispiele für die Überproduktion eines sensitiven Enzyms als Mechanismus für Toleranz gegen einen Inhibitor sind schon in der Einleitung aufgeführt worden und werden im weiteren Text in die Diskussion mit einfließen.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst durch in vivo Versuche die Glyphosattoleranz der C.sempervirens Kultur charakterisiert werden.

Bei einmaligem Transfer der sensitiven Kultur in Medium mit subletaler Glyphosatkonzentration (III.1.2.), zeigte sich ein sehr schnelle Akkumulation von Shikimat und eine 4,5-fache Steigerung der spezifischen Aktivität der EPSP Synthase. Das langsame, lineare Wachstum und die Feststellung, daß die meisten Zellen die Glyphosateinwirkung überlebten, liefert erste Hinweise auf den Toleranzmechanismus. Mutation oder auch Amplifikation des EPSP Synthase Gens lassen sich mit dieser Beobachtung nicht in Einklang bringen, da beide nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auftreten. Andererseits ist diese Schlußfolgerung mit Einschränkungen zu betrachten, da die Zellen nicht isoliert, sondern in Form großer Aggregate in Suspension vorliegen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Glyphosatkonzentrationen im Innern der Zellkonglomerate niedriger sein könnte als im Außenmedium. Dadurch könnten im Innern liegende, sensitive Zellen geschützt werden und ohne Veränderung ihrer genetischen oder physiologischen Potenz proliferieren.

Der Transfer der toleranten Kultur in glyphosatfreies Medium ergab einen langsamen Abfall der gesteigerten EPSP Synthase Aktivität (III.1.3.).

Im Falle einer mutativ veränderten EPSP Synthase bei der toleranten Kultur wäre dieses Verhalten durch Rückmutation erklärbar. Aber auch Enzymakkumulationen durch Genamplifikation können instabil sein. Sind die amplifizierten Gene im Chromosom lokalisiert, dann wird die erworbene Eigenschaft stabil weitervererbt; bei instabilen Amplifikationen liegen die zusätzlichen Genkopien als extrachromosomale Elemente ("double minute chromosomes") vor (Schimke, 1982).

Rückschlüsse auf den vorliegenden Toleranzmechanismus sind also aus diesem Versuch nicht möglich.

Während die erhöhte EPSP Synthase Aktivität in der C.sempervirens Kultur nach Entfernung des Glyphosats abnimmt, ist die gesteigerte Aktivität dieses Enzyms unter gleichen Bedingungen bei einer glyphosattoleranten Daucus carota Zellkultur über mindestens 3 Jahre stabil (Nafziger et al., 1984).

Um zu zeigen ob die EPSP Synthasen aus sensitiven und toleranten C.sempervirens Zellen identisch oder voneinander verschieden waren und so den Toleranzmechanismus aufzuklären, wurde das Enzym aus beiden Kulturen gereinigt und vergleichend charakterisiert. Als besonders hilfreich erwies sich dabei die von Steinrücken und Schulz (Schulz, 1986) entwickelte affinitätschromatographische Reinigung der EPSP Synthase über Phosphocellulose. Homogene EPSP Synthase mit stabiler Aktivität stand damit für die Versuche zur Verfügung.

Aus je sechs unabhängigen Aufarbeitungen und Reinigungen der EPSP Synthase aus beiden Kulturen wurde das Molekulargewicht des denaturierten Enzyms durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt. dieses betrug für beide Enzyme übereinstimmend 45500 D $\pm$ 1500 D (III.3.1.).

Das Molekulargewicht der nativen EPSP Synthase wurde durch Gel-filtration ermittelt und es betrug in beiden Fällen 44700 D (III.3.2.).

Die EPSP Synthase aus C.sempervirens ist also ein lösliches, monomeres Enzym.

Diese Eigenschaften und Molekulargewichte von 45 - 50 kD sind auch für alle anderen gereinigten EPSP Synthasen aus Pflanzen und Bakterien beschrieben worden (Lewendon und Coggins, 1983; Steinrücken und Amrhein, 1984a; Mousdale und Coggins, 1984; Duncan et al., 1984; Stalker et al., 1985; Erdmann, 1986; Steinrücken et al., 1986; Holländer-Czytko, 1986).

Bei einigen Pilzen ist die EPSP Synthase Teil des pentafunktionalen arom. Komplexes (Lumsden und Coggins, 1977), aber dennoch funktional der EPSP Synthase aus Bakterien homolog (Coggins, 1986).

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IEP) durch Chromatofokussierung ergab für die EPSP Synthase aus beiden Kulturen einen Wert von 5,4 (III.3.3.).

Dieser liegt höher als bei den bakteriellen EPSP Synthasen, deren IEP 4,2 - 4,6 beträgt (Steinrücken und Amrhein, 1984a; Sost et al., 1984; Schulz, 1986).

Die wichtigsten Hinweise auf die Identität der EPSP Synthasen aus beiden Kulturen und damit auf das Vorliegen einer Enzymakkumulation in den toleranten Kulturen wurden durch enzymkinetische Analysen gewonnen.

Die Übereinstimmung der K_m Werte und der K_i Werte für beide Substrate zeigt eindeutig die Identität der EPSP Synthase in beiden Kulturen (III.3.4.). Darüberhinaus zeigt die Bestimmung des

Quotienten K_i/K_m für PEP, daß beide Enzyme gleicherweise gegen-
über Glyphosat höchst sensitiv sind.

Der K_i Wert bezüglich PEP stimmt in der Größenordnung gut mit
denen gereinigter EPSP Synthasen aus anderen glyphosatsensitiven
Organismen überein: Aerobacter aerogenes 1,0 μM (Steinrücken,
1982); Neurospora crassa 1,1 μM (Boocock und Coggins, 1983);
Pisum sativum 0,08 μM (Mousdale und Coggins, 1984); Nicotiana
sylvestris 1,25 μM (Rubin et al., 1984); Petunia hybrida 0,17 μM
(Steinrücken et al., 1986); Fagopyrum esculentum 1,75 μM (Hollän-
der-Czytko, 1986) und C.sempervirens 0,32 μM (diese Arbeit).
Dabei muß berücksichtigt werden, daß diese Bestimmungen unter
verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden und bekannt ist,
daß z.B. der pH Wert einen deutlichen Einfluß auf die Hemmung
durch Glyphosat hat (Steinrücken und Amrhein, 1984b; Rubin et
al., 1984).

Die glyphosatresistente EPSP Synthase aus Aerobacter aerogenes
hat dagegen einen K_i Wert bezüglich PEP von 8 mM und einen K_i/K_m
Quotienten von 4,2 (Schulz, 1986).

In allen untersuchten Fällen erwies sich, wie bei C.sempervirens,
die Hemmung durch Glyphosat als kompetitiv bezüglich PEP.

Für S3P wurde in dieser Arbeit eine unkompetitive Hemmung durch
Glyphosat festgestellt. Dies stützt vorher gemachte gleichartige
Beobachtungen von Lewendon und Coggins, 1983; Boocock und Cog-
gins, 1983 und Rubin et al., 1984.

Diesen Ergebnissen zufolge müßte sich zunächst ein Enzym*S3P
Komplex ausbilden und PEP oder Glyphosat könnten nur an diesen
Komplex, nicht aber an das freie Enzym gebunden werden.

Das heißt, es müßte ein geordneter sequentieller Mechanismus der
Substanlagerung mit S3P als obligat zuerst bindenden Substrat
vorliegen.

Dafür spricht auch die Tatsache, daß eine Elution der EPSP Syn-
thase von der Phosphocellulose-Säule durch PEP alleine nicht
erfolgreich war (Lewendon und Coggins, 1983; diese Arbeit).

Darüberhinaus stellte Schulz (1986) beim Enzym aus Aerobacter
aerogenes fest, daß ^{14}C -S3P nicht aber ^{14}C -Glyphosat allein an
die EPSP Synthase binden konnte.

Demgegenüber fanden Anton et al. (1983) durch Inaktivierungsexpe-
rimente, daß PEP auch allein an die EPSP Synthase aus Klebsiella
pneumoniae binden konnte, aber die Affinität des Enzyms zu PEP
durch vorhergehende Bindung des S3P Analogons dd-S3P deutlich
gesteigert wurde.

Stepanek fand 1986 bei E.coli ebenfalls unkompetitive Hemmung der
EPSP Synthase durch Glyphosat bezüglich S3P.

Durch Gleichgewichtsdialyse mit radioaktiv markierten Substraten

und Inhibitionsversuche der Hinreaktion mit EPSP (Endprodukthemmung) folgte er einen Zufallsmechanismus der Substratanlagerung, da EPSP zu beiden Substraten kompetitiv war. Wenngleich vor allem aufgrund der zuletzt genannten Untersuchung der Zufallsmechanismus wahrscheinlicher erscheint, steht dennoch eine endgültige Klärung aus.

Als zusätzliches Kriterium zur Feststellung der Identität der EPSP Synthasen aus adaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Kulturen dienten immunologische Versuche. Die polyklonalen Antiseren gegen EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten Kulturen zeigten Kreuzreaktivität mit den EPSP Synthasen aus Fagopyrum esculentum und Petunia hybrida, aber nicht mit Enzym aus E.coli und Aerobacter aerogenes. Im Doppelimmuno-Diffusionstest ergab sich aufgrund der vollständigen Fusion der Präzipitationslinien kein Hinweis auf das Vorhandensein unterschiedlicher antigener Determinanten bei den EPSP Synthasen aus bei den C.sempervirens Kulturen (III.3.5.1.) Demgegenüber konnte bei den glyphosatsensitiven und toleranten Aerobacter aerogenes EPSP Synthasen im Ouchterlonytest eine deutliche Spornbildung festgestellt werden (Schulz et al., 1984). Darüberhinaus ergaben sich keine Unterschiede der gereinigten EPSP Synthasen aus beiden C.sempervirens Kulturen bei der Western Blot Analyse unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen (III.3.5.2. und III.3.5.3.), sowie bei der Hemmung der Aktivität beider Enzyme durch das polyklonale Antiserum (III.3.5.4.).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die EPSP Synthasen aus glyphosatadaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Kulturen identisch sind. Dafür sprechen alle proteinchemischen, enzymkinetischen und immunologischen Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden oder schon vorher bekannt waren (Leifeld, 1982; Johanning, 1983).

Da eine glyphosatsensitive EPSP Synthase nicht vorhanden ist, muß als Toleranzmechanismus eine Akkumulation des sensitiven Enzyms vorliegen.

Die Größenordnung dieser Akkumulation beträgt aufgrund des Vergleichs der spezifischen EPSP Synthase Aktivitäten in den Rohextrakten etwa 30 - 40 fach.

Berechnet man den Anteil der EPSP Synthase am Gesamtprotein des Rohextraktes aufgrund der durchgeführten Kalkulation (III.2.), so ergibt sich eine etwa 25-fache Akkumulation der EPSP Synthase in der toleranten Kultur.

Eine Abschätzung der Akkumulation durch Western Blot von Rohex-

trakten aus beiden Kulturen nach Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen ergab einen Wert von etwa 30-fach (III.5.3.) und war damit in guter Übereinstimmung mit den Bestimmungen mittels anderer Methoden.

Diese Quantifizierungsmethode durch Gelelektrophorese von Rohextrakten beider Kulturen mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion der EPSP Synthase wurde von C.Smart bei C.sempervirens genauer durchgeführt.

Danach enthielten die nicht adaptierten Kulturen etwa 0,06% EPSP Synthase am Gesamtprotein, während der Anteil bei den adaptierten Kulturen etwa 2,5% betrug (Smart et al., 1985).

Dieser 43-fachen Akkumulation des Enzyms auf Proteinebene entsprach eine 39-fache Steigerung der spezifischen EPSP Synthase Aktivität im Rohextrakt derselben Kulturen.

Darüberhinaus konnte durch "pulse"-Markierung mit 35 S-Methionin gezeigt werden, daß die EPSP Synthase von der adaptierten Kultur de-novo synthetisiert wird und auch einige andere Proteine vermehrt auftreten (Smart et al., 1985).

Zusammen liefern diese Ergebnisse einen weiteren Hinweis auf die EPSP Synthase als primären Wirkort von Glyphosat (Amrhein et al., 1980b) auch in pflanzlichen Zellkulturen.

Alle anderen vorgeschlagenen Wirkorte von Glyphosat, wie
-die Hemmung der DAHP-Synthase (Rubin et al., 1982; Bode et al., 1984a und 1984b),

-die Hemmung der Synthese von δ -Aminolaevulinsäure (Kitchen et al., 1981),

-die Effekte auf Indol-3-essigsäure Metabolismus und Ethylenproduktion (Lee et al., 1983),

-der Einfluß auf Photosynthese, Atmung und Assimilattransport (Cole und Dodge, 1979)

beruhen offensichtlich auf sekundären Wirkungen des Glyphosats und stellen keine Primäreffekte dar.

In einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit wurde versucht, für die Aktivität der EPSP Synthase wichtige Aminosäuren zu identifizieren und darüberhinaus Hinweise auf die Reihenfolge der Substratbindung am Enzym zu erhalten. Dabei stand vor allem die Rolle der SH-Gruppen im Vordergrund des Interesses.

Außerdem sollte die subzelluläre Lokalisation der EPSP Synthase in den C.sempervirens Zellen aufgeklärt werden.

Erste Versuche zur Inaktivierung der EPSP Synthase durch alkylierende, gruppenspezifische Reagenzien wurde von Anton et al. (1983) und von Steinrücken und Amrhein (1984b) durchgeführt.

Steinrücken und Amrhein setzten unter anderem auch N-Ethylmaleimid (NEM) ein und fanden eine deutliche Inaktivierung der EPSP Synthase von Aerobacter aerogenes, die durch Vorinkubation des Enzyms mit Glyphosat drastisch vermindert wurde, während die Substrate der Reaktion weniger effektiv waren. Sie schlossen daraus, daß Glyphosat auch in Abwesenheit von S3P an die EPSP Synthase binden kann und eine größere Affinität zum Enzym hat als PEP.

Sie schlugen eine SH-Gruppe als schwache Säure im aktiven Zentrum der EPSP Synthase vor, um die pH-Abhängigkeit der Glyphosatwirkung und die Inaktivierung durch NEM zu erklären (Steinrücken und Amrhein, 1984b).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung von SH- und NH₂-Gruppen (Cystein- und Lysinresten) für die Aktivität der EPSP Synthase aus C. sempervirens deutlich gemacht werden (III.4.1.1. und III.4.1.2.), ohne daß daraus direkt auf eine Lokalisation einer der beiden funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum geschlossen werden konnte.

Die hier durchgeführten Inaktivierungsexperimente mit NEM an pflanzlichen EPSP Synthasen aus C. sempervirens und Petunia hybrida bestätigen deutlich die Hemmung der Inaktivierung durch Vorinkubation mit Glyphosat, während PEP ohne Wirkung ist.

Dieser Unterschied kann durch die wesentlich größere Affinität des Enzyms zu Glyphosat im Vergleich zu PEP erklärt werden (siehe kinetische Daten). Andererseits könnte Glyphosat auch an einer anderen Stelle als PEP am Enzym gebunden werden und so, durch Änderung der sterischen Konformation des Enzyms, die Inaktivierung verhindern.

Dies ist allerdings mit der kompetitiven Hemmung von Glyphosat bezüglich PEP und der daraus abgeleiteten Vorstellung von Glyphosat als Übergangszustandsanalogon nicht zu vereinbaren und erscheint wenig wahrscheinlich.

Überraschend ist die unterschiedliche Inaktivierung nach Vorinkubation mit S3P bei den beiden untersuchten pflanzlichen EPSP Synthasen. Während bei C. sempervirens kein Einfluß festzustellen war, wurde die Inaktivierung bei Petunia hybrida unter identischen Bedingungen deutlich gehemmt.

Auch EPSP zeigte bei beiden Enzymen eine unterschiedliche Wirkung auf die Inaktivierung mit NEM.

Eine eingehendere Diskussion dieser Effekte soll nicht erfolgen, da, wie schon in III.4.1.3. dargestellt, die Enzympräparationen vermutlich trotz Dialyse nicht ligandenfrei vorlagen. Deshalb ist eine genaue Analyse der Beeinflussung der Inaktivierung und eine Ableitung der Reihenfolge der Substratbindung am Enzym nicht

möglich.

Die verwendeten Dialysebedingungen reichen im allgemeinen aus, um Liganden vollständig zu entfernen. Im Verlauf dieser Versuche zeigte Stepanek aber, daß Glyphosat und S3P nur sehr langsam von der EPSP Synthase von E.coli abdissoziieren und durch Dialyse nicht vollständig entfernt werden können (Stepanek und Amrhein, unveröffentlicht).

Anschließende Versuche, ligandenfreie EPSP Synthase aus C.sempervirens Kulturen durch konventionelle Reinigung und HPLC zu isolieren zeigten aber, daß drei verschiedene Enzymformen vorlagen, die sich nur durch die Bindung verschiedener Liganden unterscheiden (III.4.1.3.).

Als mögliche Liganden kommen dabei alle Substrate der EPSP Synthase in Frage und zusätzlich Glyphosat, da die adaptierten Kulturen immer in glyphosathaltigem Medium angezogen wurden. Die Präparation ligandenfreier EPSP Synthase aus dieser pflanzlichen Zellkultur stellt sich daher als schwieriger dar, als dies zum Beispiel bei Bakterien der Fall ist.

Auch ein Einfluß gebundener Liganden auf die SH-Gruppenbestimmung kann nicht ausgeschlossen werden. Mit der Methode von Ellman wurden für die affinitätschromatographisch gereinigte EPSP Synthase aus C.sempervirens zwei SH-Gruppen/Molekül im denaturierten und nativen Zustand ermittelt.

Krüper bestimmte 1985 mit derselben Methode und gleichartig gereinigter EPSP Synthase zwei SH-Gruppen des denaturierten Enzyms aus E.coli.

Konventionell gereinigte EPSP Synthasen aus E.coli (Stepanek, 1986) und aus Aerobacter aerogenes (Schulz, 1986) besitzen, nach der Ellman-Methode bestimmt, sechs SH-Gruppen.

Daß Glyphosat eine große Affinität zur EPSP Synthase aus C.sempervirens hat, beweist der niedrige K_i Wert von Glyphosat. Ob aber die bei bakterieller EPSP Synthase festgestellte große Affinität zu S3P auch für pflanzliche EPSP Synthasen zutrifft bleibt ungeklärt, solange nicht pflanzliches Enzym in größerer Menge zur Klärung dieser Frage, zum Beispiel durch Gleichgewichtsdialysen, zur Verfügung steht.

Während die Reinigung und Charakterisierung von EPSP Synthasen aus Bakterien und pflanzlichen Zellkulturen Gegenstand eingehender Untersuchungen war, blieb deren subzelluläre Lokalisierung in Pflanzenzellen weitgehend ungeklärt. Durch frühe Versuche zur Lokalisierung des Shikimatweges wurde nur festgestellt, daß dieser vollständig in den Chloroplasten und eventuell zusätzlich

partiell im Cytoplasma vorhanden ist (siehe dazu Fiedler und Schultz, 1985).

Während der Durchführung der eigenen Versuche zur Lokalisierung der EPSP Synthase in C. sempervirens Zellen veröffentlichten Mousdale und Coggins (1985) Versuche zur Lokalisierung einiger Enzyme des Shikimatweges, unter anderem auch der EPSP Synthase, bei Pisum sativum Keimlingen.

Sie fanden durch HPLC Analyse die Hauptaktivität der EPSP Synthase plastidär lokalisiert, und etwa 4 - 7,5% der Aktivität als extraplastidäres Isoenzym.

Für glyphosatadaptierte und nicht adaptierte C. sempervirens Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Hauptaktivität ebenfalls in den Plastiden lokalisiert ist. Das Vorhandensein eines Isoenzyms in geringer Menge kann aufgrund der durchgeführten Versuche nicht ausgeschlossen werden, da ein hierfür notwendiges Markerenzym für Etioplasten nicht bekannt ist (siehe III.4.2.).

Versuche zur Lokalisierung der EPSP Synthase aus C. sempervirens Pflanzen durch Dichtegradienten-Zentrifugation scheiterten, da in diesem Fall keine EPSP Synthase Aktivität meßbar war.

Gegen die Existenz von Isoenzymen der EPSP Synthase bei der hier untersuchten Kultur sprechen die Ergebnisse der verschiedenen Reinigungsmethoden, die in keinem Fall die Existenz von Isoenzymen offenbarten.

Auch durch eine andere, immunocytochemische Methode wurde für die C. sempervirens Kultur die Lokalisierung der EPSP Synthase in den Plastiden bestätigt (Smart und Amrhein, 1987). Diese Autoren inkubierten Ultradünnschnitte der Zellen mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen C. sempervirens EPSP Synthase und machten die gebundenen Antikörper durch Bindung von Gold-markiertem Protein A direkt im Elektronenmikroskop sichtbar.

Eigene Versuche zur Sichtbarmachung der EPSP Synthase in den C. sempervirens Zellen auf lichtmikroskopischer Ebene durch fluoreszenzmarkierte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper ergaben keine spezifischen Reaktionen und sind deshalb nicht dargestellt.

Joop stellte 1985 bei Spinatblättern durch Dichtegradienten-Zentrifugation fest, daß dort die EPSP Synthase ebenfalls in den Plastiden lokalisiert war.

Eine genaue Quantifizierung nach nichtwässriger Extraktion und Zentrifugation (nach der Methode von Gerhardt und Heldt, 1984) ergab, daß 91,8% der EPSP Synthase Aktivität in den Chloroplasten und 8,2% im Cytoplasma lokalisiert waren.

Die Anwendung dieser Methode war bei den heterotrophen C. semper-

virens Kulturen nicht möglich, da wie schon erwähnt, für Etio-plasten kein Markerenzym bekannt ist, das nur in diesen Organellen vorkommt.

Mit derselben Methode gelang auch die Feststellung der prozentualen Verteilung von Glyphosat in den subzellulären Kompartimenten der Apikalregion von Spinatpflanzen (Joop, 1985).

Daraus wurden dann die Glyphosatkonzentrationen im Cytoplasma (1,14 mM), im Chloroplastenstroma (64,6 μ M) und in der Vakuole (13,2 μ M) berechnet.

Untersuchungen an Spinatblättern bestätigten diese subzelluläre Verteilung von Glyphosat (Munder, 1986).

Die Glyphosatkonzentration im Stroma, in dem die EPSP Synthase lokalisiert ist, erscheint zunächst relativ gering, aber durch Inhibitionsversuche mit lysierten Chloroplasten von Pisum sativum konnte gezeigt werden, daß bereits 5 μ M Glyphosat bei Anwesenheit von 0,1 mM PEP und 0,5 mM S3P die EPSP Synthase Aktivität zu 64% hemmten (Mousdale und Coggins, 1985). Die berechnete Glyphosatkonzentration im Stroma würde also zur vollständigen Hemmung der EPSP Synthase ausreichen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß in allen untersuchten Pflanzen und pflanzlichen Kulturen die EPSP Synthase zum Überwiegenden Teil in den Plastiden lokalisiert ist.

Welche Bedeutung der teilweise festgestellten geringen Aktivität im Cytoplasma zukommt, bleibt weiterhin ungeklärt.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die molekularbiologischen Ursachen der EPSP Synthase Überproduktion der glyphosatadaptierten C.sempervirens Kultur auf DNA Ebene aufzuklären.

Den analogen Fall einer glyphosattoleranten Petunia hybrida Zellkultur hatten Steinrücken et al.(1986) beschrieben und gefunden, daß diese 15 - 20 fach mehr EPSP Synthase akkumulieren als sensitive Vergleichskulturen.

Shah et al.(1986) untersuchten daraufhin die molekularen Ursachen dieser Enzymakkumulation.

Durch die Synthese eines geeigneten Oligonukleotids und anschließende Hybridisierungsexperimente zeigten sie einen erhöhten m-RNA Gehalt für EPSP Synthase in der adaptierten Kultur. Nach Anlegen und Testen einer lambda gt10 cDNA Bank von Petunia hybrida wurden geeignete Klone in Plasmid pUC 9 rekloniert.

Es konnten verschiedene cDNA Klone, die Teile oder die gesamte kodierende Sequenz der EPSP Synthase beinhalten, isoliert werden.

Diese wurden zur Quantifizierung der m-RNA und DNA von toleranten und sensitiven Kulturen eingesetzt.

Shah et al. fanden eine 20-fach erhöhte m-RNA Gehalt in der toleranten Kultur, der auf eine 20-fache Amplifikation des Gens für EPSP Synthase zurückgeführt werden konnte (Shah et al., 1986).

Ähnlich genaue quantitative Untersuchungen über Genamplifikation als Ursache einer Enzymakkumulation sind aus Untersuchungen an Säugerzellen bekannt (zusammengefaßt bei Schimke, 1982, und bei Stark und Wahl, 1984).

Bei pflanzlichen Zellkulturen ist nur ein gleichartiges Beispiel bekannt. Donn et al. (1984) zeigten bei Luzerne Zellkulturen, daß die Phosphinotricintoleranz einer Kultur auf eine 3 - 7 fache Akkumulation von Glutamin-Synthetase zurückzuführen war. Sie fanden darüberhinaus einen etwa 8-fachen Anstieg der entsprechenden m-RNA und eine 4 - 11 fache Amplifikation des Glutamin-Synthetase Gens.

Für die C. sempervirens Kultur war durch die hier vorgestellten Ergebnisse und andere (Smart et al., 1985) gezeigt worden, daß die EPSP Synthase in glyphosatadaptierten Kulturen etwa 30 - 40 fach gegenüber nicht adaptierten Kulturen akkumuliert ist. Holländer-Czytko und Amrhein zeigten 1987, daß in denselben Kulturen die Menge an translatierbarer m-RNA Aktivität für EPSP Synthase nur etwa 10-fach erhöht ist. Ebenso war der Gehalt an m-RNA für EPSP Synthase in den adaptierten Kulturen nur etwa 8 - 12 fach gegenüber den nicht adaptierten Kulturen erhöht. Dieses wurde bestimmt durch Hybridisierung von polyadenylierter RNA mit demselben Oligonukleotid, welches auch für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche eingesetzt wurde (Amrhein et al., 1986).

Die Sequenz dieses Oligonukleotids wurde aus der Aminosäuresequenz des N-Terminus der EPSP Synthase von C. sempervirens abgeleitet und für die Quantifizierung der EPSP Synthase Gene (U.4.) benutzt.

In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob wie im Fall der glyphosattoleranten Petunia hybrida Kultur auch bei C. sempervirens eine Amplifikation des EPSP Synthase Gens vorlag.

Durch Restriktionsanalyse der chromosomalen DNA adaptierter und nicht adaptierter Zellen, Southern Blot und Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid wurde gezeigt, daß mit dieser Methode unter den verwendeten Bedingungen nur jeweils ein DNA Fragment hybridisierte. Dadurch war die Spezifität der Hybri-

disierung sichergestellt. Die Hybridisierung mit mehreren DNA Fragmenten war aufgrund der geringen Größe des verwendeten Oligonukleotids auch nicht zu erwarten.

Der Vergleich der Reaktion gleicher DNA Mengen aus beiden Kulturen zeigte etwa gleich starke Hybridisierung, aber eine eindeutige Quantifizierung der EPSP Synthase Genkopien wurde mit dieser Methode nicht erreicht (V.4.1.).

Durch Dot-Blot Analyse ungeschnittener DNA konnte allerdings eindeutig gezeigt werden, daß die Hybridisierung des Oligonukleotids mit DNA aus beiden Kulturen quantitativ gleich war und keine Amplifikation des EPSP Synthase Gens in der toleranten C.sempervirens Kultur vorlag (V.4.2.).

Insgesamt sind damit die molekularen Ursachen der EPSP Synthase Überproduktion der adaptierten C.sempervirens Kultur komplexer, als es bei Petunia hybrida der Fall ist.

Eine mögliche Erklärung muß den Tatsachen einer nicht vorhandenen Genamplifikation, eines ungefähr 10-fach erhöhten m-RNA Gehaltes und einer 30 - 40 fachen Akkumulation der EPSP Synthase in den adaptierten Kulturen Rechnung tragen.

Deshalb muß eine Änderung der Regulation sowohl auf transkriptionaler, wie auch auf translationaler/posttranslationaler Ebene bei der adaptierten C.sempervirens Kultur vorhanden sein.

Beispiele von Toleranz von Zellen gegenüber Inhibitoren durch Enzymakkumulation, die nicht auf einer entsprechenden Genamplifikation beruht, sind für einige Säuger-Zellkulturen bekannt.

Su et al. (1981) fanden, daß die Canavanin-Resistenz einer menschlichen Zellvariante auf Akkumulation der Argininosuccinat-Synthase beruhte und durch eine gleich große Erhöhung des m-RNA Gehaltes für dieses Enzym verursacht wurde. Da keine Genamplifikation festzustellen war, postulierten sie eine transkriptionale Regulationsänderung als Ursache der beobachteten Phänomene.

In Anwesenheit von Inhibitoren der Ornithin-Decarboxylase konnten Ascites Tumorzellen durch Akkumulation des Enzyms wachsen (Persson et al., 1985). Da keine Steigerung des m-RNA Gehaltes für dieses Enzym in den Kulturen festgestellt werden konnten, wurde eine veränderte Abbaurate des Enzyms und eine Stimulation der Enzymsynthese als Ursachen der Akkumulation vorgeschlagen.

Spätere Versuche bestätigten die postulierte Regulation auf translationaler Ebene, die in diesem Fall durch die Reaktionsendprodukte des Biosynthesewegs vermittelt wurde (Persson et al., 1986).

Mc Conlogue et al. zeigten 1983, daß Mauszellvarianten bei Wachstum in Anwesenheit eines Inhibitors der Ornithin-Decarboxylase (ODC) dieses Enzym überproduzierten und dies auf eine Amplifikation des entsprechenden Gens zurückzuführen war.

Spätere Versuche offenbarten, daß andere Varianten der gleichen Zellen Enzymakkumulation durch andere Mechanismen erlangten (Mc Conlogue et al., 1986).

Alle untersuchten Zellvarianten zeigten keine Genamplifikation, keine veränderte Abbaurate des Enzyms, hatten aber alle erhöhte m-RNA Gehalte der ODC.

Bei einer Variante deckten sich die Erhöhung des m-RNA Gehaltes und die entsprechende Enzymakkumulation.

Bei einer zweiten Variante war aber die ODC Akkumulation 4 - 8 fach größer als der entsprechende m-RNA Gehalt.

Für den ersten Fall wurde eine gesteigerte Transkriptionsrate, gesteigerte Effizienz von "processing" oder Transport oder eine größere Stabilität der m-RNA postuliert.

Für den zweiten Fall wurde zusätzlich eine gesteigerte Translationsrate angenommen.

Die translationalen/posttranslationalen Regulationsmechanismen könnten auf einer gesteigerten Translationsrate oder auf einem verminderten Abbau des reifen Enzyms beruhen.

Diese Beispiele verdeutlichen, daß Enzymakkumulation nicht nur durch Genamplifikation, sondern auch durch verschiedene andere Mechanismen auf allen Ebenen der Proteinbiosynthese, und sogar gleichzeitig durch mehrere Mechanismen auf verschiedenen Ebenen bewirkt werden kann.

In Anbetracht dieser Beispiele erscheint die Akkumulation der EPSP Synthase von glyphosattoleranten C. sempervirens Zellen auch als Modellsystem für die Untersuchung von Regulationsmechanismen der Enzymakkumulation bei Pflanzen interessant zu sein.

Eine weiterführende Untersuchung müßte eine genaue Analyse auf Transkriptions- und Translationsebene umfassen, und auch posttranslationale Prozesse, etwa eine Stabilisierung des nativen Enzyms, berücksichtigen.

Diese Beispiele verdeutlichen die Bedeutung von Zellkulturen für die Aufklärung der molekularen Ursachen von Toleranzmechanismen.

Auch bei den Untersuchungen der Grundlagen der Wirkungen von Herbiziden, der Identifizierung ihrer primären Wirkorte und der molekularen Grundlagen von Toleranz erwies sich sowohl am Beispiel von Glyphosat, wie auch bei den Sulfonylharnstoffherbiziden

der Einsatz von Bakterien und toleranten Zellkulturen als besonders erfolgreich (Jaworski, 1972; Steinrücken und Amrhein, 1980; La Rossa und Schloss, 1984; Scheel und Casida, 1985). Weitere detaillierte proteinchemische Untersuchungen der pflanzlichen EPSP Synthase könnten erleichtert oder erst ermöglicht werden durch Klonierung und Expression der kodierenden cDNA aus Pflanzen in geeigneten Bakterien, wie dies beispielhaft für die E.coli EPSP Synthase von Rogers et al.(1983) durchgeführt wurde. Die Verfügbarkeit größerer Mengen gereinigter pflanzlicher EPSP Synthase würde eine genaue Analyse der Reihenfolge der Substratbindung am Enzym erleichtern oder eine Kristallisation der EPSP Synthase ermöglichen, wie dies für die EPSP Synthase aus E.coli bereits durchgeführt wurde (Abdel-Meguid et al., 1985).

Darüberhinaus würde die Möglichkeit eröffnet, neue Hemmstoffe der EPSP Synthase leichter zu finden und vielleicht durch Veränderung der Struktur des Enzyms selbst, resistente EPSP Synthasen zu konstruieren.

Ein wesentliches Ziel bei der Untersuchung von Herbiziden ist die Erzeugung herbizidtoleranter Kulturpflanzen.

Diese kann durch Mutation und Selektion pflanzlicher Zellen und deren Regeneration zu intakten Pflanzen erreicht werden, wie dies im Falle von sulfonylharnstofftoleranten Tabakpflanzen gelang (Chaleff und Ray, 1984). Selektion toleranter Einzelzellen und deren Regeneration ermöglichte auch die Herstellung von glyphosattoleranten Tabakpflanzen (Singer und Mc Daniel, 1985). Die Regeneration intakter Pflanzen aus Einzelzellen ist aber nur bei einigen Arten, vor allem aus der Familie der Solanaceen möglich, nicht aber bei den für die Ernährung interessanten Kulturpflanzen.

Die Erzeugung toleranter pflanzlicher Einzelzellen ist auch durch gerichteten Transfer Herbizidtoleranz vermittelnder Gene pflanzlicher oder bakterieller Herkunft möglich (Fraley et al., 1983; van den Broeck, 1985). Die Regeneration der transformierten Einzelzellen bleibt aber auch dann als Problem vorhanden. Zwei prinzipiell unterschiedliche Wege zur gentechnologischen Erzeugung glyphosattoleranter Pflanzen sind denkbar: der Transfer bakterieller oder pflanzlicher Gene.

Comai et al.(1985) transformierten Tabakzellen mit dem EPSP Synthase Gen aus glyphosattoleranten Salmonella typhimurium Bakterien und fanden nach Regeneration der Pflanzen eine Expression des bakteriellen Gens in den Tabakpflanzen.

Die erreichte Glyphosattoleranz war allerdings niedriger als

ursprünglich erwartet worden war.

Die Erklärung dafür ist offensichtlich, daß die EPSP Synthase in Pflanzen Überwiegend plastidär lokalisiert ist (Mousdale und Coggins, 1985; Joop, 1985; diese Arbeit Abschnitt III.4.2.). Holländer-Czytko und Amrhein (1987) konnten für die EPSP Synthase aus C. sempervirens und della Cioppa et al. (1986) für Petunia hybrida zeigen, daß das Enzym als Präkursor mit höherem Molekulargewicht synthetisiert wird. Es beinhaltet neben dem reifen Enzym ein Peptid, das den gerichteten Transport und die Einbringung der EPSP Synthase in die Plastiden gewährleistet. Da dieses in der bakteriellen Enzymform nicht vorhanden ist unterbleibt der gerichtete Transport der Salmonella EPSP Synthase in die Tabachloroplasten und damit eine hohe Effizienz der Toleranzübertragung in vivo.

Die Notwendigkeit eines aminoterminalen Transportpeptids ("transit peptide") für den gerichteten Transport eines Präkursors wurde für Chloroplasten (Cashmore et al., 1985; Schmidt und Mishkind, 1986) und Mitochondrien (Neupert et al., 1981) gezeigt. Della Cioppa et al. (1986) bestätigten diese Bedeutung des "transit peptide" durch Transportversuche mit der EPSP Synthase und deren Präkursor-Form aus Petunia hybrida auch für dieses Enzym.

Shah et al. (1986) benutzten zur Transformation von Petunia Zellen ein chimäres Genkonstrukt, das neben der kompletten Sequenz der Präkursor-Form der EPSP Synthase aus Petunia einen konstitutiven pflanzlichen Promoter enthielt. Transformierte Kalli zeigten in vitro eine 20-fach erhöhte spezifische EPSP Synthase Aktivität und regenerierte Pflanzen eine deutliche Glyphosattoleranz, da in dem verwendeten Genkonstrukt auch die Information für das Transportpeptid enthalten und so der gerichtete subzelluläre Transfer des Enzyms in die Chloroplasten gewährleistet war.

Die durch die Einbringung von fremdem genetischen Material mögliche Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen (Hardy und Giaquinta, 1984; Gressel et al., 1984) eröffnet, neben grundlegenden Kenntnissen, neue Perspektiven für die Agrarwirtschaft.

Resistente Kulturpflanzen gegen neue, noch weniger toxische Herbizide könnten dazu beitragen, die ökologischen Probleme des Einsatzes von Herbiziden zu minimieren.

Die Erforschung von Herbizidtoleranz liefert aber auch grundlegende Informationen der pflanzlichen Physiologie und Genetik und es erscheint aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse durchaus wahrscheinlich, daß auch andere nützliche Eigenschaften (z.B. Resistenz gegen Viren oder Pilze) in Pflanzen übertragen werden können.

U. Zusammenfassung

1. Die Wirkungen des Herbizids Glyphosat (N-(phosphonomethyl)-glycin) bei Corydalis sempervirens Zellkulturen wurden in vivo festgestellt und der Toleranzmechanismus einer glyphosatadaptierten Kultur untersucht.
2. Glyphosatadaptierte C.sempervirens Zellkulturen hatten eine 30 - 40 fach gesteigerte 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat (EPSP) Synthase Aktivität im Vergleich zu nicht adaptierten Kulturen.
3. Der Transfer nicht adaptierter Zellen in Medium mit Glyphosat verursachte eine schnelle Akkumulation von Shikimisäure und einen deutlichen Anstieg der EPSP Synthase Aktivität. Transfer und Subkultivierung adaptierter Zellen in Medium ohne Glyphosat zeigte, daß die gesteigerte EPSP Synthase Aktivität unter diesen Bedingungen wieder verloren ging.
4. Gereinigte EPSP Synthase aus adaptierten und nicht adaptierten C.sempervirens Kulturen erwies sich als lösliches, monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von circa 45000 D.
5. Vergleichende Charakterisierung der gereinigten EPSP Synthesen aus adaptierten und nicht adaptierten Kulturen ergab, neben einem Übereinstimmenden isoelektrischen Punkt, identische Werte bei der Bestimmung enzymkinetischer Parameter. EPSP Synthase aus beiden Kulturen war in vitro glyphosatsensitiv. Die Hemmung durch Glyphosat war kompetitiv bezüglich Phosphoenolpyruvat (PEP) und unkompetitiv bezüglich Shikimisäure-3-phosphat (S3P).
6. Polyklonale Antiseren gegen die EPSP Synthase aus glyphosatadaptierten C.sempervirens Kulturen wurden erzeugt. Verschiedene immunologische Untersuchungen der gereinigten EPSP Synthesen aus beiden Kulturen zeigten ebenfalls keine Unterschiede der Enzyme.
7. Aufgrund der Identität der EPSP Synthesen aus beiden Kulturen wurde als Ursache der Aktivitätssteigerung eine Akkumulation der EPSP Synthase bei der adaptierten Kultur angenommen. Eine ungefähre Abschätzung ergab eine etwa 30-fache Akkumulation der EPSP Synthase in dieser Kultur.

8. Die EPSP Synthase aus C.sempervirens war durch N-Ethylmaleimid und Pyridoxalphosphat inaktivierbar, wodurch die Annahme der Beteiligung von Lysin- und Cysteinresten am katalytischen Prozeß gestützt wurde.
9. Die EPSP Synthase aus C.sempervirens besitzt keine Disulfidbrücken. Unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen konnten für das Enzym zwei SH-Gruppen nachgewiesen werden.
10. Dichtegradienten-Zentrifugation von C.sempervirens Zellorganellen zeigte, daß die EPSP Synthase überwiegend oder ganz plastidär lokalisiert war.
11. Eine Gesamtaminosäure-Analyse der EPSP Synthase aus C.sempervirens wurde durchgeführt und das aminoterminal Ende des Enzyms sequenziert. Zur Quantifizierung der EPSP Synthase Gene in adaptierten und nicht adaptierten Kulturen wurde ein dieser kodierenden Sequenz entsprechendes Oligonukleotid synthetisiert. Nach radioaktiver Markierung wurde dieses als Sonde für das EPSP Synthase Gen benutzt.
12. Nach der Isolierung hochmolekularer DNA aus beiden Kulturen wurde durch Analyse der Restriktionsmuster geschnittener DNA und Dot-Blot Untersuchungen gezeigt, daß keine Amplifikation der Kopienzahl der EPSP Synthase Gene bei der glyphosatadaptierten gegenüber der nicht adaptierten C.sempervirens Kultur vorlag.

VI. Literaturverzeichnis

Abdel-Meguid, S.S., Smith, W.W., Bild, G.S., 1985.

Crystallisation of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from Escherichia coli. J. Mol. Biol., 186: 673.

Amrhein, N., Holländer-Czytko, H., Leifeld, J., Schulz, A., Steinrücken, H.C., Topp, H., 1982.

Inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. In: Groupe Polyphenols. Journées Internationales d'Etudes et Assemblées Générales. Boudet, A.M. und Ranjeva, R. (eds.), Bulletin d'Liaison, 11: 21-30.

Amrhein, N., Johanning, D., Schab, J., Schulz, A., 1983.

Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. FEBS-Lett., 157: 191-196.

Amrhein, N., 1986.

Specific inhibitors as probes into the biosynthesis and metabolism of aromatic amino acids.

Rec. Adv. Phytochem., 20: in press.

Anton, D.L., Hedstrom, L., Fish, S.M., Abeles, R.H., 1983.

Mechanism of enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase exchange of phosphoenolpyruvate with solvent protons. Biochemistry, 22: 5903-5908.

Ashton, F.M., Crafts, A.S., 1981.

Mode of action of herbicides. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, pp. 239-245.

Baillie, A.C., Corbett, J.R., Dowsett, J.R., McCloskey, P., 1972.

Inhibitors of shikimate dehydrogenase as potential herbicides. Pestic. Sci., 3: 113-120.

Baird, D.D., Upchurch, R.P., Homesley, W.B., Franz, J.E., 1971.

Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. Proc. North Cent. Weed Cont. Conf., 26: 64-68.

Balthazor, T.M. und Hallas, L.E., 1986.

Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. Appl. Environ. Microbiol., 51: 432-434.

Beisenherz, G., 1955.

Triosephosphate isomerase from calf muscle. In: Methods in Enzymology, 1, 387-391.

Bode, R., Melo Ramos, C., Birnbaum, D., 1984a.

Inhibition of tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase by glyphosate in Candida maltosa. FEMS Microbiol. Lett., 23: 7-10.

Bode, R., Melo, C., Birnbaum, D., 1984b.

Mode of action of glyphosate in Candida maltosa. Arch. Microbiol., 140: 83-85.

Bondinell, W.E., Unek, J., Knowles, P.F., Sprecher, M., Sprinson, D.B., 1971.

On the mechanism of 5-enlpyruvylshikimate 3-phosphate synthetase. J. Biol. Chem., 246: 6191-6196.

Boocock, M.R. und Coggins, J.R., 1983.

Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS Lett., 154: 127-133

Boudet, A.M., Graziana, A., Ranjeva, R., 1985.

Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: The Biochemistry of Plant Phenolics. Van Sumere, C.F., Lea, P.J. (eds.), Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 25, Clarendon Press, Oxford.

Bradford, M.M., 1976.

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

Bülow, S., Link, G., 1986.

A general and sensitive method for staining DNA and RNA blots. Nucleic Acids Res., 14: 3973.

Cashmore, A., Szabo, L., Timko, M., Kausch, A., Van den Broeck, G., Schreier, P., Bohnert, H., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J., 1985.

Import of polypeptides into chloroplasts. Bio/Technology, 3: 803-808.

Chaleff, R.S. und Mauvais, C.J., 1984.

Acetolactate syntase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, 224: 1443-1445.

Chaleff, R.S. und Ray, I.B., 1984.

Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, 223: 1148-1151.

Chance, B., Maehly, A.C., 1955.

Assay of catalases and peroxidases. In: *Methods in Enzymology*, II: 764-775.

Christopherson, R.I. und Duggleby, R.G., 1983.

Metabolic resistance: The protection of enzymes against drugs which are tight-binding inhibitors by the accumulation of the substrate. *Eur. J. Biochem.*, 134: 331-335.

Coggins, J.R., 1986.

Enzymology and molecular biology as aids for the invention and improvement of herbicides. In: *Biotechnology and Crop Improvement and Protection*. Day, P.R. (ed.), British Crop Protection Council, London, pp. 101-110.

Cole, D.J., Dodge, A.D., 1979.

Effects of glyphosate on protein synthesis and phenylalanine metabolism in rhizome buds of Agropyron repens. *Plant Physiol. Suppl.*, 63: 96.

Comai, L., Sen, L.C., Stalker, D.M., 1983.

An altered aroA gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science*, 221: 370-371.

Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W.R., Thompson, G., Rose, R.E., Stalker, D.M., 1985.

Expression in plants of a mutant aroA gene from Salmonella typhimurium confers tolerance to glyphosate. *Nature*, 317: 741-744.

Davis, R.W., Botstein, D., Roth, J.R., 1980.

Hybridization to DNA or RNA on solid support. In: *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

- della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Gasser, C.S., Tumer, N.E., Shah, D.M., Fraley, R.T., Kishore, G.M., 1986.
Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Plant Physiol.*, 80: 127-133.
- Donn, G., Tischer, E., Smith, J.A., Goodman, H.M., 1984.
Herbicide-resistant alfalfa cells: An example of gene amplification in plants. *J. Mol. Appl. Genet.*, 2: 621-635.
- Duncan, K., Lewendon, A., Coggins, J.R., 1984.
The complete amino acid sequence of Escherichia coli 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *FEBS Lett.*, 170: 59-63.
- Ellis, J.R., 1981.
Chloroplast proteins: Synthesis, transport and assembly. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32: 111-137.
- Ellman, G.L., 1959.
Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Erdmann, R., 1986.
Reinigung und Charakterisierung einer Glyphosat-insensitiven 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase aus Pseudomonas aeruginosa PA01. Diplomarbeit. Ruhr Universität Bochum.
- Fedtke, C., 1982.
Biochemistry and physiology of herbicide action. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Feierabend, J., Brassel, D., 1977.
Subcellular localisation of shikimate dehydrogenase in higher plants. *Z. Pflanzenphys.* 82: 334-346.
- Fiedler, E., Schultz, G., 1985.
Localisation, purification and characterization of shikimate oxidoreductase-dehydroquinase hydrolase from stroma of spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 79: 212-218.
- Franz, J.E., 1979.
Glyphosate and related chemistry. In: *Advances in Pesticide Science*. Part 2. Geissbühler, H., (ed.), Pergamon Press, Oxford and New York, pp. 139-147.

- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Morsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C., 1983.
Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803-4807.
- Gerhardt, R., Heldt, H.W., 1984.
Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. Plant Physiol., 75: 542-547.
- Gibson, F., Pittard, J., 1968.
Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and their control in microorganisms. Bact. Rev., 32: 465-492.
- Gilissen, L.J.W., Hänisch ten Cate, C.H., Keen, B., 1983.
A rapid method of determining growth characteristics of plant cell populations in batch suspension cultures. Plant Cell Rep., 2: 232-235.
- Gottrup, O., O'Sullivan, P.A., Schraa, R.J., Vandenborn, W.H., 1976.
Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in Canada thistle and leafy spurge. Weed Res., 16: 197-201.
- Gougler, J.A. und Geiger, D.R., 1981.
Uptake and distribution of N-(phosphonomethyl)glycine in sugar beet plants. Plant Physiol., 68: 668-672.
- Gressel, J., Cohen, N., Binding, H., 1984.
Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of Solanum nigrum with S.tuberosum. 2. Segregation of plastomes. Theor. Appl. Genet., 67: 131-134.
- Gressel, J., 1985.
Herbicide tolerance and resistance: Alteration of site of activity. In: Weed Physiology Vol. II. Herbicide Physiology. Duke, S.D., (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 159-189.
- Grimshaw, C.E., Sogo, S.G., Knowles, J.R., 1982.
The fate of the hydrogens of phosphoenolpyruvate in the reaction catalyzed by 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. J. Biol. Chem., 257: 596-598.

- Haderlie, L.C., Widholm, J.M., Slife, F.W., 1977.
Effects of glyphosate on carrot and tobacco cells. *Plant Physiol.* 60: 40-43.
- Hardy, R.W.F. und Giaquinta, R.T., 1984.
Molecular biology of herbicides. *BioEssays*, 1: 152-156.
- Haslam, E., 1974.
The shikimate pathway. *Biosynthesis of natural products series*.
Barton, D., Kirby, G., (eds.). Butterworths, London.
- Hatzios, K.K., Penner, D., 1982.
Metabolism of herbicides in higher plants. CEPCO Division,
Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota.
- Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J., 1982.
A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies.
Anal. Biochem., 119: 142-147.
- Heinrikson, R.L. und Meredith, S.C., 1984.
Amino acid analysis by reversed phase high performance liquid
chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocya-
nate. *Anal. Biochem.*, 136: 65-74.
- Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Dreyer, W.J., 1981.
A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol.*
Chem. 256: 7990-7997.
- Hirs, C.H.W., 1967.
Reduction and S-carboxymethylation of proteins. *Methods in*
Enzymology, 11: 199-203.
- Holländer-Czytko, H., 1986.
Glyphosate tolerance in a buckwheat cell suspension culture.
Abstract No. 2460. 17th FEBS-Meeting, Berlin.
- Holländer-Czytko, H., Amrhein, N., 1987.
5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, the target enzyme of
the herbicide glyphosate, is synthesized as a precursor in a
higher plant. *Plant Physiol.*, in press.
- Jacob, G.S., Schaefer, J., Stejskal, E.O., Mac Kay, R.A., 1985.
Solid-state NMR determination of glyphosate metabolism in a *Pseu-*
domonas sp.. *J. Biol. Chem.*, 260: 5899-5905.

Jaworski, E.G., 1972.

The mode of action of N-phosphonomethyl-glycine. Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. J. Agric. Food Chem., 20: 1195-1198.

Johanning, D., 1983.

Anreicherung und Charakterisierung der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase aus glyphosatadaptierten Corydalis sempervirens Zellkulturen. Diplomarbeit. Ruhr Universität Bochum.

Joop, O., 1985.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase und der Wirkung des Herbizides Glyphosat in höheren Pflanzen. Dissertation. Ruhr Universität Bochum.

Kitchen, L.M., Witt, W.W., Rieck, C.E., 1981.

Inhibition of α -aminolevulinic acid synthesis by glyphosate. Weed Science, 29: 571-577.

Knowles, P.F. und Sprinson, D.B., 1970.

Preparation of shikimate 5-phosphate. In: Methods in Enzymology, 17: 351-352.

Konigsberg, W., 1972.

Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. Methods in Enzymology, 25: 185-188.

Krüper, A., 1985.

Bindung von Substraten und Inhibitoren an die 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase aus Escherichia coli. Diplomarbeit. Ruhr Universität Bochum.

Laemmli, U.K., 1970.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A., 1979.

An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Anal. Biochem., 100: 95-97.

LaRossa, R.A und Schloss, J.U., 1984.

The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in Salmonella typhimurium. J.Biol. Chem., 259: 8753-8758.

Leason, M., Cunliffe, D., Parkin, D., Lea, P.J., Mifflin, B.J., 1982.

Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulfoximine, phosphinothricin and other glutamate analogues.

Phytochemistry, 21: 855-857.

Lee, T.T., Dumas, T., Jevinkar, J.J., 1983.

Comparison of the effects of glyphosate and related compounds on indol-3-acetic acid metabolism and ethylene production in tobacco callus. Pestic. Biochem. Physiol., 20: 354-359.

Leifeld, J., 1982.

Anreicherung und Charakterisierung der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat Synthase aus Corydalis sempervirens Zellkulturen.

Staatsexamensarbeit. Ruhr Universität Bochum.

Levin, J.G. und Sprinson, D.B., 1964.

The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate. J. Biol. Chem., 239: 1142-1150.

Levitt, G., Ploeg, H.L., Weigel, jr., R.C., Fitzgerald, D.J., 1981.

2-Chloro-N(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonyl-benzenesulfonamide, a new herbicide. J. Agric. Food Chem., 29: 416-424.

Lewendon, A. und Coggins, J.R., 1983.

Purification of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from Escherichia coli. Biochem. J., 213: 187-191.

Linsmaier, E.M., Skoog, F., 1965.

Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 19: 110-127.

Lumsden, J. und Coggins, J.R., 1977.

The subunit structure of the aroC multienzyme complex of Neurospora crassa. A possible pentafunctional polypeptide chain.

Biochem. J., 161: 599-607.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982.

Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Maruyama, H., Easterday, P.L., Chang, H.-C., Lane, M.D., 1966.
The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate.
I. Purification and properties of phosphoenolpyruvate-carboxylase.
J. Biol. Chem., 241: 2405-2412.
- Maurer, H.R., 1968.
Discelectrophoresis. de Gruyter, Berlin.
- Maxam, A.M., Gilbert, W., 1980.
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
Methods Enzymol., 65: 499.
- Mc Conlogue, L., Coffino, P., 1983.
A mouse lymphoma cell mutant whose major protein product is
ornithine decarboxylase. J. Biol. Chem., 258: 12083-12086.
- Mc Conlogue, L., Dana, S.L., Coffino, P., 1986.
Multiple mechanisms are responsible for altered expression of
ornithine decarboxylase in overproducing variant cells. Mol.
Cell. Biol., 6: 2865-2871.
- Means, G.E., Feeney, R.E., 1971.
Chemical modification of proteins. Holden-Day, San Francisco,
pp. 195-196 und 219.
- Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E., Korte, H., Heilmeyer, jr.,
L.M.G., 1986.
Sequence analysis of phosphoserine-containing peptides. FEBS
Letters, 204: 61-66.
- Mousdale, D.M. und Coggins, J.R., 1984.
Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate
synthase from seedlings of Pisum sativum L. Planta, 160: 78-83.
- Mousdale, D.M. und Coggins, J.R., 1985.
Subcellular localisation of the common shikimate-pathway enzymes
in Pisum sativum L. Planta, 163: 241-249.
- Munder, T., 1986.
Kompartimentierung von Enzymen und Metaboliten des Shikimisäure-
weges in Mesophyllzellen höherer Pflanzen unter Einfluß des Her-
bizids Glyphosat. Diplomarbeit. Ruhr Universität Bochum.

- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980.
Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8: 4321-4326.
- Nafziger, E.D., Widholm, J.M., Steinrücken, H.C., Killmer, J.L., 1984.
Selection and characterisation of a carrot cell line tolerant to glyphosate. *Plant. Physiol.*, 76: 571-574.
- Neupert, W., Schatz, G., 1981.
How proteins are transported into mitochondria. *Trend. Biochem. Sci.*, 6: 1-4.
- Nimmo, H.G. und Nimmo, G.A., 1982.
A general method for the localisation of enzymes that produce phosphate, pyrophosphate, or CO₂ after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 121: 17-22.
- Ohyama, K., 1976.
A basis for bromodeoxyuridine resistance in plant cells. *Environ. Exp. Bot.*, 16: 209-216.
- Duchterlong, D., 1949.
Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 26: 507-515.
- Persson, L., Oredsson, S.M., Anehus, S., Heby, O., 1985.
Ornithine decarboxylase inhibitors increase the cellular content of the enzyme: Implications for translational control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131: 239-245.
- Persson, L., Holm, I., Heby, O., 1986.
Translational regulation of ornithine decarboxylase by polyamines. *FEBS Lett.*, 205: 175-178.
- Pipke, R., Amrhein, N., Jacob, G.S., Schaefer, A.E., Kishore, G.M., 1987.
Metabolism of glyphosate in an *Athrobacter* sp. GLP-1. *Eur. J. Biochem.*, in press
- Putnam, A.R., 1976.
Fate of glyphosate in deciduous fruit trees. *Weed Sci.*, 24: 425-430.

Ray, T.B., 1984.

Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valin and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol.*, 75: 827-831.

Ray, T.B., 1986.

Sulfonylurea herbicides as inhibitors of amino acid biosynthesis in plants. *Trends in Biological Science*, 11: 180-183.

Riddles, P.W., Blakeley, R.L., Zerner, B., 1983.

Reassessment of Ellman's reagent. In: *Methods of Enzymology*, 91: 49-60.

Robyt, J.F., Ackermann, R.J., Chittenden, C.G., 1971.

Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: A case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in *Aspergillus oryzae* α -amylase, papain and lysozyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 147: 262-269.

Rogers, S.G., Brand, L.A., Holder, S.B., Sharps, E.S., Brackin, M.J., 1983.

Amplification of the *aroA* gene from *Escherichia coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 37-43.

Rubin, J.L., Gaines, C.G., Jensen, R.A., 1982.

Enzymological basis for herbicidal action of glyphosate. *Plant Physiol.*, 70: 833-839.

Rubin, J.L., Gaines, C.G., Jensen, R.A., 1984.

Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.*, 75: 839-845.

Rueppel, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J., Marvel, J.T., 1977.

Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *J. Agric. food Chem.*, 25: 517-528.

Saijo, R., Takeo, T. 1979.

Some properties of the initial four enzymes involved in shikimic acid biosynthesis in tea plant. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 1427-1432.

- Scheel, D. und Casida, J.E., 1985.
Sulfonylurea herbicides: growth inhibition in soybean cell suspension cultures and in bacteria correlated with block in biosynthesis of valine, leucine, or isoleucine. Pestic. Biochem. Physiol., 23: 398-412.
- Schimke, R.T., 1982.
Gene amplification. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Schmidt, G.W., Mishkind, M.L., 1986.
The transport of proteins into chloroplasts. Ann. Rev. Biochem., 55: 879-912.
- Schulz, A., Sost, D., Amrhein, N., 1984.
Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase to glyphosate confers resistance to this herbicide in a strain of Aerobacter aerogenes. Arch. Microbiol., 137: 121-123.
- Schulz, A., 1986.
Biochemische Grundlagen der Glyphosatresistenz in Bakterien. Dissertation. Ruhr Universität Bochum.
- Shah, D.M., Horsch, R.B., Klee, H.J., Kishore, G.M., Winter, J.A., Tume, N.E., Hironaka, C.M., Sanders, P.R., Gasser, C.S., Aykent, S., Siegel, N.R., Rogers, S.R., Fraley, R.T., 1986.
Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233: 478-481.
- Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J., 1973.
Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose. Biochemistry 12: 3055.
- Shimamoto, K., Nelson, D.E., 1981.
Isolation and characterisation of aminopterin-resistant cell lines in maize. Planta 153: 436-442.
- Shinabarger, D.L., Braymer, H.D., 1986.
Glyphosate catabolism by Pseudomonas sp. strain PG 2982. J. Bacteriol., 168: 707-707.

- Singer, S.R. und McDaniel, C.N., 1985.
Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants. *Plant Physiol.*, 78: 411-416.
- Smart, C.C., Johanning, D., Müller, G., Amrhein, N., 1985.
Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.*, 260: 16338-16346.
- Smart, C.C., Amrhein, N., 1987.
Ultrastructural localization by protein A-gold immunocytochemistry of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which overproduces the enzyme. *Planta*, 170: 1-6.
- Smyth, D.G., Nagamatsu, A., Fruton, J.S., 1960.
Some reactions of N-ethylmaleimid. *J. Amer. Chem. Soc.*, 82: 4600-4604.
- Sost, D., Schulz, A., Amrhein, N., 1984.
Characterisation of a glyphosate-insensitive 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *FEBS Lett.*, 173: 238-242.
- Southern, E., 1975.
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-518.
- Sprankle, P., Megitt, W.F., Penner, D., 1975.
Absorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Sci.*, 23: 235-240.
- Stalker, D.M., Hiatt, W.R., Comai, L., 1985.
A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.*, 260: 4724-4728.
- Stark, G.R. and Wahl, G.M., 1984.
Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 447-491.
- Steinrücken, H.C., 1982.
Zur Wirkungsweise des Herbizids Glyphosat: Einfluß auf die 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase aus Aerobacter aerogenes 62-1. Dissertation. Ruhr Universität Bochum.

Steinrücken, H.C. und Amrhein, N., 1980.

The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 94: 1207-1212.

Steinrücken, H.C. und Amrhein, N., 1984a.

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase of Klebsiella pneumoniae. 1. Purification and properties. Eur. J. Biochem., 143: 341-349.

Steinrücken, H.C. und Amrhein, N., 1984b.

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase of Klebsiella pneumoniae. 2. Inhibition by glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine). Eur. J. Biochem., 143: 351-357.

Steinrücken, H.C., Schulz, A., Amrhein, N., Porter, C.A., Fraley, R.T., 1986.

Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate tolerant Petunia hybrida cell line. Arch. Biochem. Biophys., 224: 169-178.

Stepanek, F., 1986.

Untersuchungen der Ligandenbindung an die Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat Synthase aus Escherichia coli. Diplomarbeit. Ruhr Universität Bochum.

Su, T.S., Bock, H.-G.O., O'Brian, W.E., Beaudet, A.L., 1981.

Cloning of cDNA for argininosuccinate synthetase mRNA and study of enzyme overproduction in a human cell line. J. Biol. Chem., 256: 11826-11831.

Tarr, G.E., 1985.

Manual Edman sequencing system. In: Microcharacterization of polypeptides: A practical manual. Shively, J.E. (ed.). Humana Press, New Jersey.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354.

Treffer, U., 1987.

Inaktivierung der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat Synthase aus Escherichia coli durch Pyridoxal-5-phosphat: Identifizierung der Bindungsstelle. Diplomarbeit. Ruhr Universität Bochum.

van den Broeck, G., Timko, M.P., Kausch, A.P., Cashmore, A.R., van Montagu, M., Herrera-Estrella, L., 1985.

Targetting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Nature*, 313: 358-363.

Weiler, E.W. und Zenk, M.H., 1976.

Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochem.*, 15: 1537-1545.

Widholm, J.M., 1972.

The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47: 189-194.

Yamaya, T., Filner, P., 1981.

Resistance to acetohydroxamate acquired by slow adaptive increases in urease in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, 67: 1133-1140.

An dieser Stelle möchte ich allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der Ruhr Universität Bochum für ihre Unterstützung danken, besonders bei Herrn Hubert Winking für die Anfertigung von Photos und Zeichnungen.

Herrn Dr. H. Meyer vom Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Ruhr Universität Bochum danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalyse und der Proteinsequenzierung.

Mein persönlicher Dank gilt Prof. Dr. N. Amrhein.

Lebenslauf

14.02.1959	geboren in Essen als Sohn des Ingenieurs Reiner Johanning und seiner Ehefrau Anna, geb. Linkamp.
Apr.1965 - Jun.1968	Besuch der Volksschule in Essen
Aug.1968 - Jun.1977	Besuch des Humboldt-Gymnasiums in Essen, Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife am 18.06.1977
Okt.1977 - Jun.1983	Studium der Biologie an der Ruhr Universität Bochum, Abschluß mit dem akademischen Grad Diplom-Biologe am 13.06.1983
seitdem	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr Universität Bochum und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. N. Amrhein.

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606